

# THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR-INGÉNIEUR

par

**Bernard ROUX**

---

Première Thèse

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES FLAVONOÏDES  
DE CITRUS LIMONUM

---

Deuxième Thèse

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

---

Soutenues le 24 Octobre 1964 devant la Commission d'Examen :

MM. J. COLONGE

Président

J. CHOPIN

H. PACHECO

} Membres du Jury



# THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR-INGÉNIEUR

par

**Bernard ROUX**

Ingénieur-Chimiste E. S. C. I. L.  
Licencié ès-Sciences

---

## Première Thèse

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES FLAVONOÏDES  
DE CITRUS LIMONUM

---

## Deuxième Thèse

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

---

Soutenues le 24 Octobre 1964 devant la Commission d'Examen :

MM. J. COLONGE

Président

J. CHOPIN

H. PACHECO

}

Membres du Jury



UNIVERSITE DE LYON  
FACULTE des SCIENCES

Doyens honoraires

MM. LONGCHAMBON, DOUIN, MOUSSA, GAUTHIER Henri

Professeurs honoraires

MM. LOCQUIN, de LARAMBERGUE, SOLLAUD, MENTZER, MOUSSA, JAFFARD,  
DOUIN, Henri EYRAUD, DEJARDIN, VIRET.

Doyen

M. BRACONNIER

Assesseurs

MM. MESNARD, BOIDIN.

Professeurs

|                    |                                    |
|--------------------|------------------------------------|
| MM. LONGCHAMBON    | Minéralogie                        |
| PRETTRE            | Chimie industrielle                |
| COURTY             | Chimie-Physique                    |
| KUHNER             | Botanique                          |
| MALECOT            | Mécanique rationnelle et appliquée |
| PARIS              | Chimie minérale                    |
| AUMERAS            | Chimie                             |
| COLONGE            | Chimie organique                   |
| JANIN              | Physique générale                  |
| FLANDRIN           | Géologie appliquée                 |
| BERNARD            | Physique industrielle              |
| DUFAY Jean         | Astronomie                         |
| NIGON              | Zoologie expérimentale             |
| GAUTHIER Henri     | Géologie générale                  |
| WAUTIER            | Zoologie                           |
| CHOPIN             | Chimie biologique                  |
| CUEILLERON         | Chimie                             |
| BRACONNIER         | Calcul différentiel et intégral    |
| EYRAUD Charles     | Chimie-Physique appliquée          |
| SARAZIN            | Physique nucléaire                 |
| BOIDIN             | Microbiologie et Mycologie         |
| PERES              | Physiologie                        |
| MESNARD            | Electronique                       |
| GRANDMONTAGNE      | Physique                           |
| BOUTILIER          | Minéralogie                        |
| LAFOUCRIERE        | Physique nucléaire théorique       |
| DREUX              | Chimie organique                   |
| TEICHNER           | Chimie industrielle                |
| PAVANS DE CECCATTY | Zoologie                           |
| MERLIN             | Chimie analytique                  |
| DUFAY Maurice      | Physique de l'atmosphère           |
| LUBET              | Physiologie                        |
| PHILBERT           | Physique nucléaire                 |
| COHEN-ADAD         | Chimie                             |
| DAVID Louis        | Géologie générale                  |

|               |                                       |
|---------------|---------------------------------------|
| MM. CHANEL    | Psychophysiologie                     |
| MAURY         | Méthodes Mathématiques de la Physique |
| DEPRAZ        | Physique nucléaire                    |
| GAUTHIER Jean | Chimie                                |
| GAUME         | Physique                              |

#### Professeurs sans Chaire

|               |                                 |
|---------------|---------------------------------|
| MM. FERON     | Mathématiques                   |
| LAFORGUE      | Physique                        |
| LEGAY         | Zoologie expérimentale S.P.C.N. |
| UZAN          | Physique S.P.C.N.               |
| CHENEVOY      | Géologie appliquée              |
| GINET         | Zoologie                        |
| ASCH          | Physique                        |
| MICHEL Pierre | Minéralogie                     |
| DUCET         | Biologie végétale               |
| Mle MAITROT   | Physique                        |
| MM. GEVIN     | Géologie générale               |
| PONASSE       | Mathématiques                   |
| d'INCAN       | Physique                        |
| LEFEBVRE      | Mathématiques                   |
| PERNET        | Mathématiques                   |
| CHERY         | Physique                        |
| BERGEON       | Physique C.S.U.                 |
| Mle GAUTHERON | Chimie biologique               |

#### Maîtres de Conférences

|                 |                       |
|-----------------|-----------------------|
| Mme ERICSON     | Physique générale     |
| MM. MARTEL      | Mécanique             |
| MATHIEU         | Mécanique des Fluides |
| ERBEIA          | Physique              |
| DESCOTES        | Chimie organique      |
| PICARD Philippe | Mathématiques         |
| LEMOIGNE        | Botanique             |
| DEMARCO         | Géologie générale     |
| MICHEL Georges  | Biochimie             |
| LEBRETON        | Biologie végétale     |
| DAVID Jean      | Biologie animale      |
| TOUSSET         | Chimie propédeutique  |
| FEUVRAIS        | Physique Electricité  |
| PICARD Claude   | Mathématiques         |
| SCHMITT         | Physique M.P.C.       |
| LAURENT         | Chimie organique      |
| ROT             | Mathématiques         |

#### Maître de Conférences adjoint

|            |        |
|------------|--------|
| M. PIERRON | Chimie |
|------------|--------|

#### Conseiller administratif

|           |
|-----------|
| M. BURNET |
|-----------|

#### Secrétaire Principal Honoraire

|         |
|---------|
| M. ROUX |
|---------|

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. CHOPIN

Professeur de Chimie Biologique  
à la Faculté des Sciences de Lyon



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41553420\\_0027](https://archive.org/details/IA41553420_0027)

## AVANT-PROPOS

Le présent travail a été effectué de 1961 à 1964 au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lyon.

Nous ne saurions l'exposer sans exprimer à notre Maître, Monsieur le Professeur J. CHOPIN, notre respectueuse et profonde reconnaissance pour la bienveillante sollicitude avec laquelle il nous a initié à la Recherche et sans cesse guidé.

Nous adressons nos vifs remerciements à Monsieur le Professeur J. COLONGE qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider notre Jury.

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur H. PACHECO d'avoir accepté de faire partie de notre Jury.

Que la Société PROGIL et tout particulièrement Messieurs DEGEORGES et FILLET, Directeurs du Centre de Recherches de Lyon, soient ici remerciés pour l'aide matérielle sans laquelle ce travail n'aurait pu être mené à sa fin.

Nous remercions également les Laboratoires Français de Thérapeutiques qui nous ont fourni la matière première nécessaire à nos extractions.

Il nous est particulièrement agréable de remercier Mademoiselle A. DURIX dont la collaboration précieuse a permis la réalisation d'une partie de ce travail.

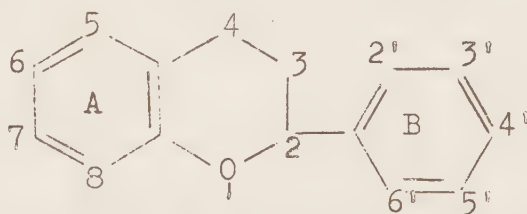
Puissent enfin tous nos camarades de laboratoire trouver ici l'expression de notre sincère amitié.



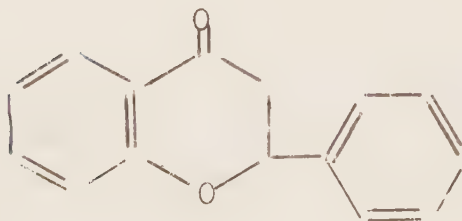
## INTRODUCTION

Les flavonoïdes sont des substances polyphénoliques naturelles que l'on rencontre exclusivement dans le règne végétal. Cependant seules les plantes vasculaires, c'est-à-dire les Phanérogames et les Fougères, parmi les Cryptogames, renferment ces corps. Dans les plantes inférieures-Mousses, Champignons, Algues-aucun de ceux-ci n'a pu être mis en évidence de façon certaine.

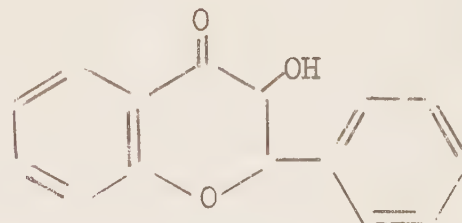
Malgré leur grande diversité de structure, tous ces pigments présentent l'enchainement  $C_6-C_3-C_6$  que l'on rencontre par exemple dans le phényl-2 chromanne :



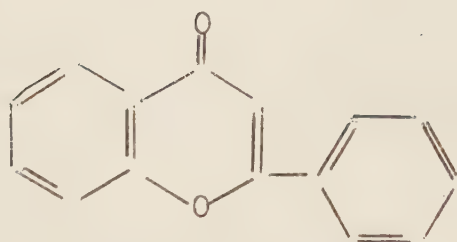
La présence de groupement cétonique en 4, la déshydrogénation entre 2 et 3 et l'introduction de groupe hydroxyle en 3 conduisent à des corps étroitement apparentés :



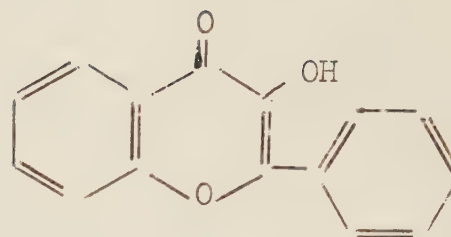
flavanone



flavanonol



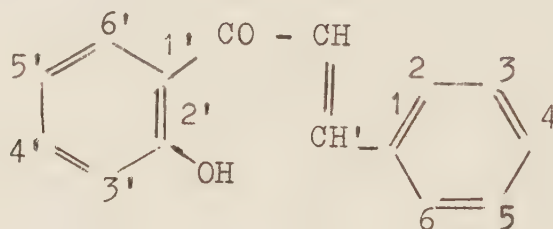
flavone



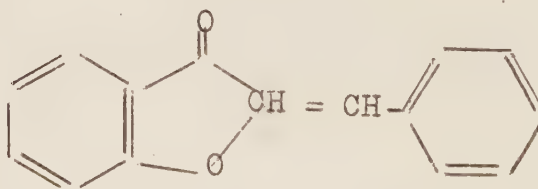
flavonol

On peut y rattacher d'autres substances présentant le même enchainement:

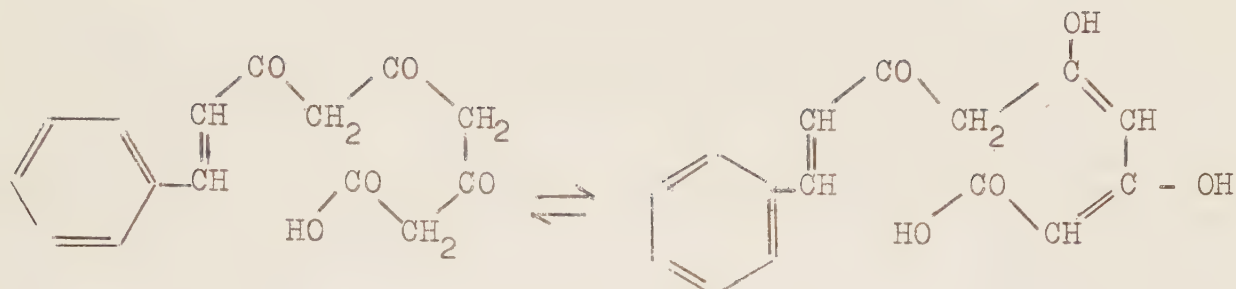
Les hydroxy-2' chalcones isomères des flavanones par ouverture de l'hétérocycle



et les aurones ou benzal-2 coumaranone-3



L'étude de la biogénèse de ces composés a montré que le noyau B provient d'un acide en  $C_6-C_3$  qui se combine à trois restes acétiques produisant le noyau A selon :



Il résulte de cette formation que les substituants portés par le noyau A sont essentiellement en position 5 et 7. Des réactions ultérieures provoquent la présence de substituants en position 3 en particulier. Dans le noyau B se sont les positions 3', 4' et 5' qui sont le plus fréquemment occupées.

Ces substituants sont en général des groupements hydroxyles ou méthoxyles, mais parfois des groupements méthylène-dioxy- $\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$ .

Ces pigments se présentent fréquemment sous forme de glycosides où le sucre est attaché à l'aglycone par l'intermédiaire d'un groupe hydroxyle. Ici encore, il paraît y avoir des positions privilégiées: les liaisons osidiques se formant surtout en 3, 7 et 4'.

A côté de ces flavonoïdes O-glycosylés, l'existence de composés où le sucre est lié à l'aglycone par une liaison C-C a été récemment reconnue et il est apparu que les C-glycosides étaient beaucoup plus répandus qu'on ne le pensait au premier abord.

L'intérêt initialement porté aux composés flavoniques provenait de leur rôle dans la coloration des fruits et des fleurs, certains étant parmi les colorants naturels les plus anciennement connus.

Mais très rapidement l'attention s'est portée sur leurs propriétés thérapeutiques et dès 1936 SZENT-GYÖRGYI constata

que certains extraits de Citron - contenant des flavonoïdes - avaient une action sur la résistance et la perméabilité des capillaires sanguins. Il proposa le terme de vitamine P pour désigner le composé responsable de cette activité. En fait il est apparu à la suite de nombreux travaux que plusieurs flavonoïdes, isolés d'ailleurs d'autres végétaux que le Citron, sont actifs; il y a donc absence de spécificité. D'autre part ces substances ne sont pas indispensables dans l'alimentation. Le terme de vitamine P n'est donc plus accepté et on les considère plutôt comme des "facteurs accessoires de l'alimentation" (LAVOLLAY). Finalement pour éviter toute controverse, B.L. OSER et E.F. BRYANT suggérèrent le terme de Bioflavonoïdes.

Ce mot englobe en fait des extraits bruts dont la composition est mal connue; pour cette raison nous avons étudié un extrait de Citron, qui est la source principale de ces composés, extrait d'ailleurs exploité commercialement, en nous attachant particulièrement au contenu en glycosides.

Le genre Citrus, appartenant à la famille des Rutacées, a donné lieu à quantités de travaux. Cependant à cause du grand nombre d'espèces et de variétés à l'intérieur du genre, les auteurs semblent s'être attachés à déterminer la présence de quelques glycosides bien connus dans une ou plusieurs variétés données. La composition en aglycones est mieux connue, en particulier les aglycones fortement substitués qui paraissent abondants non seulement dans le genre, mais encore dans la famille des Rutacées; et GEISSMAN décrit ce fait "comme un exemple remarquable de la possibilité pour un groupe de plantes étroitement voisines de réaliser une seule voie de synthèse."

A cette remarque, on peut rattacher l'intérêt des composés flavoniques pour des études de taxonomie. En effet certains

problèmes de systématique végétale paraissent être difficilement résolus par la Botanique seule, et il est intéressant de pouvoir disposer de critères supplémentaires. L'analyse chimique des constituants végétaux paraît susceptible d'apporter dans ce domaine des arguments nouveaux. Mais tous les composés ne peuvent être utilisés, en particulier les constituants fondamentaux des organismes (sucres, certains acides aminés) ou ceux qui se rencontrent exclusivement dans une seule espèce. De ce point de vue les flavonoïdes sont particulièrement intéressants, car ils sont abondants dans le règne végétal et ne semblent pas participer directement aux processus métaboliques fondamentaux. De nombreux travaux (ERDTMAN, BATE-SMITH, HASEGAWA, LEBRETON) ont d'ailleurs montré que l'étude de la distribution de ces composés pouvait apporter des données très utiles en taxonomie. Nous n'avons donc pas négligé cet aspect de la biochimie flavonique dans notre travail.

Celui-ci sera divisé en trois chapitres :

- Le premier concerne les méthodes d'étude des extraits flavoniques naturels, en insistant plus particulièrement sur celles que nous avons utilisées.
- Dans le second chapitre nous exposerons nos résultats après avoir rappelé les composés déjà isolés dans le genre Citrus.
- Enfin le troisième chapitre est consacré à un essai de synthèse de l'ériodictyol (tétrahydroxy-5,7,3',4' flavanone) un des constituants essentiels de l'extrait, et ceci nous a amené à observer et à étudier certaines réactions anormales de benzyla-tion des acétophénones.

## CHAPITRE I

### METHODES D'ISOLEMENT ET DE CARACTERISATION

Lorsqu'on aborde l'étude des composés naturels, il est nécessaire d'effectuer les trois opérations suivantes :

- extraction du matériel
- séparation des constituants de l'extrait
- caractérisation et détermination de leur structure.

Nous allons décrire les méthodes employées pour les composés flavoniques.

#### 1.1 Extraction

Les pigments flavoniques sont dissous dans le suc cellulaire en concentration généralement très faible. Des conditions exceptionnelles peuvent cependant provoquer la cristallisation spontanée de ces corps dans la plante elle-même. C'est ainsi que GARY(I) observe la formation de cristaux d'hespéridine(rutinoside-7 de la trihydroxy-5,7,3' méthoxy-4' flavanone) dans la pulpe de l'Orange à la suite d'un gel suivi d'un dégel.

Les plantes renferment ces composés dans tous les tissus. En général, ils se présentent sous forme de glycosides dans les tiges, les feuilles, les fleurs, les fruits et sous forme d'aglycones dans les racines, le bois ou l'écorce. Par conséquent, malgré des exceptions, les procédés d'extraction dépendent de l'origine du matériel et des impuretés que l'on peut y rencontrer. Les graines sont par exemple riches en graisses et en pro-

téines, les feuilles en résines, graisses et chlorophylles, qu'il faut éliminer. SARIN et SESHADRI (2) éliminent les huiles essentielles, les graisses et les cires de la peau séchée à l'air de l'Orange (Citrus aurantium var. Kamala) par deux extractions de 24 heures à froid à l'éther de pétrole (P.E 60-80°).

Les procédés d'extraction peuvent être envisagés à deux fins:

- dans le but d'obtenir des quantités relativement importantes d'un seul corps ou d'un mélange simple de composés que l'on peut ensuite séparer par cristallisation fractionnée,

- en vue de faire passer directement en solution le maximum de produits que l'on séparera ensuite par chromatographie. C'est surtout cette seconde façon d'opérer qui est actuellement employée à cause des grandes possibilités offertes par cette technique.

On peut donc mener une extraction en utilisant

- soit des solvants de polarité croissante qui dissoudront chacun un nombre restreint de composés,

- soit un solvant unique dont le choix dépend de la nature des substances à extraire : aglycones ou glycosides.

Les solvants les plus utilisés sont: l'éther de pétrole, l'éther éthylique, l'acétone qui permettent de séparer les aglycones les plus substitués (3,4,5) le méthanol, l'éthanol aqueux ou même l'eau que l'on utilise surtout pour l'extraction de glycosides (6,7).

Le procédé d'extraction par solvants de polarité croissante a été réalisé sur les Citrus par exemple par VENTUNELLA, BELLINO et CUSMANO (8) qui extraient la peau séchée de Citrus deliciosa var. Tenore par cinq solvants différents: éther de pétrole, éther éthylique, chloroforme, acétate d'éthyle, méthanol.

Les solvants organiques ne sont pas en fait les seuls employés. On peut jouer sur les propriétés acides des flavonoïdes, par exemple les composés possédant un groupe hydroxyle en ortho du groupe carbonyle sont solubles dans le carbonate. La rutine (rutosido-3 de la pentahydroxy-3,5,7,3',4' flavone) est extraite du Citrus Hybride (9) en traitant l'écorce par la soude 3N par agitation pendant une heure. De même un brevet japonais préconise l'emploi de la chaux et de la soude 15 % pour extraire l'héspéridine du Citrus aurantium (10).

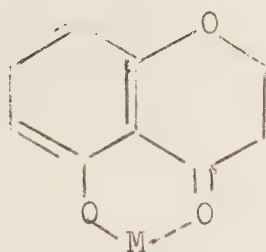
Il importe enfin de toujours signaler l'origine et les traitements subis par l'échantillon végétal extrait. Il peut y avoir en effet des phénomènes d'autolyse causés par des enzymes qui aboutissent soit à des hydrolyses soit à des oxydations. Certains corps extraits peuvent être en fait des artefacts dus à ces réactions (11).

## 1.2 Techniques d'analyse des extraits

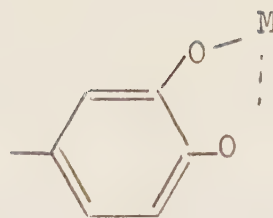
Les extraits obtenus étant souvent complexes, il est nécessaire d'effectuer ensuite la séparation des constituants soit par des méthodes chimiques, soit par des méthodes physiques.

### 1.2.1 Précipitation par les sels de plomb

Une propriété intéressante des flavonoïdes est de former avec les ions métalliques lourds des chélates stables. D'après GEISSMANN (12) ces chélates se forment si un groupement hydroxyle est en ortho d'un groupement carbonyle, ou bien d'un autre hydroxyle selon les schémas (I) et (II) :



(I)



(II)

Du point de vue analytique, la formation de ces complexes a reçu de nombreuses applications; nous les verrons plus loin pour la chromatographie (1.2.2.3) et pour la spectroscopie U.V. (I.4). Signalons ici son emploi pour la simplification des mélanges. On utilise alors des solutions hydroalcooliques d'acétate de plomb, neutre ou basique. Jusqu'à présent ce procédé servait surtout à la clarification des extraits. En ajoutant le sel neutre de plomb et en faisant passer un courant d'hydrogène sulfuré dans la solution, le sulfure qui précipite entraîne les impuretés et les matières colloïdales (13).

L'utilisation de l'acétate de plomb pour précipiter les flavonoïdes eux-mêmes a été assez limitée. Signalons l'isolement du graveobioside A (apioglucoside de la tétrahydroxy-5,7,3', 4' flavone) et du graveobioside B (apioglucoside-7 de la trihydroxy-5,7,3' méthoxy-4' flavone), à partir d'un extrait alcoolique des graines d'Apium graveolens. Le premier possédant deux hydroxyles en ortho (3' et 4') donne un précipité orange avec l'acétate neutre, alors que le second donne un précipité jaune avec le sel basique (14). En milieu neutre il se forme des chélates du type (II) et en milieu alcalin ce sont ceux du type (I) qui précipitent. Nous avons employé cette technique pour isoler les composés ortho-diphénoliques des extraits de l'écorce de Citron.

Le mélange obtenu par de tels procédés est encore trop complexe en général et il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques, en particulier à la chromatographie sur papier

et sur colonne.

### 1.2.2 Chromatographie sur papier

L'emploi de la chromatographie sur papier est en progression très rapide depuis les travaux de BATE-SMITH en 1948 (15,16). En effet la plupart des composés flavoniques se prêtent facilement à cette méthode : l'échelle de solubilité est très grande et on peut les révéler aisément en lumière visible ou en U.V., avec ou sans réactifs.

La réalisation pratique ayant été décrite de nombreuses fois dans différents articles (17,18,19,20), nous indiquerons rapidement que l'on peut utiliser:

- la chromatographie analytique qui s'effectue

- soit en une seule dimension; ceci permet le choix du solvant le plus résolutif, la détermination du Rf et la comparaison avec des substances témoins choisies en se rapportant à des tables de Rf données par de nombreux auteurs (17,18,22,23),

- soit en deux dimensions quand le mélange est trop complexe; l'emploi de deux solvants de composition différente dans deux directions perpendiculaires permet une meilleure séparation. On peut ainsi suivre l'efficacité d'une extraction,

- et la chromatographie préparative, monodimensionnelle, où l'on sépare et isole les différents corps présents dans un extrait végétal sur des feuilles de papier qui sont découpées en bandes après révélation par un procédé qui ne modifie pas les substances, puis éluées. L'opération est répétée sur l'éluat de chaque bande si ce dernier se révèle encore hétérogène.

#### 1.2.2.1 Choix du papier

Le choix du papier dépend du but cherché. Nous avons réalisé par exemple la séparation des Citroflavonoïdes sur du papier épais Whatman n°3 ou Arches 310, alors que nous avons

employé du Whatman n°1 pour les chromatographies bidimensionnelles analytiques.

Pour améliorer la séparation des composés de structure très voisine, il peut être avantageux d'utiliser un papier imprégné d'un réactif pouvant réagir avec l'un des constituants du mélange, ce qui modifie la valeur des Rf. On peut utiliser la propriété des flavonoïdes de donner des chélates avec les métaux lourds: papiers imprégnés de chlorure d'aluminium, d'acétate de plomb(24) ou avec certains anions comme les borates ou les phosphates (25,26).

#### 1.2.2.2 Solvants

Un très grand nombre de solvants peut être employés. Ils sont soit aqueux, soit alcooliques ou phénoliques.

L'eau permet de séparer les aglycones- qui ont des Rf pratiquement nuls-des glycosides (28,29).

Pour la chromatographie préparative, les acides organiques dilués comme l'acide acétique à 15,30 ou 60 % donnent de bons résultats car ils permettent de séparer, à partir des extraits bruts, les sucres. les acides aminés ou hydroxylés.

Les solvants alcooliques sont surtout à base de butanol normal. On utilise des concentrations variables du mélange n-butanol-acide acétique-eau (B.A.W.). La composition la plus classique est 4:1:5 en volume; mais ce système étant biphasique, il peut se produire des démixions.

Le phénol et le m.crésol saturés d'eau sont les solvants phénoliques les plus courants.

#### 1.2.2.3 Révélation des composés flavoniques

La révélation des composés flavoniques après chromatographie sur papier est facile. Quelques uns sont visibles à la

lumière du jour (aurones, chalcones) les autres, sauf les flavanones, en lumière U.V. En exposant le papier aux vapeurs d'ammoniaque, on voit apparaître, toujours en U.V. des couleurs caractéristiques selon le groupe auquel appartiennent les corps (17).

Certains réactifs, d'autre part, permettent leur observation en lumière visible. Par exemple WENDER et ses collaborateurs indiquent sept techniques de révélation (17,18). Les plus employées font appel soit à des agents alcalins (carbonate de sodium en solution aqueuse) soit à des sels de métaux lourds pour la formation de complexes comme le chlorure d'aluminium ou le chlorure ferrique. On peut faire apparaître les composés flavoniques en utilisant les réactions des groupes phénoliques: par diazotation par exemple avec la benzidine bisdiazotée (30) ou par réduction à l'aide du nitrate d'argent ammoniacal (22). La vitesse de révélation dépend alors du nombre et de la position des hydroxyles, ce qui peut être utilisé du point de vue structural.

Enfin la pulvérisation sur le chromatogramme d'une solution dans l'isopropanol de borohydrure de sodium, suivie d'une exposition à l'acide chlorhydrique gazeux, donne une coloration magenta caractéristique des flavanones et des flavanonols (31).

#### 1.2.2.4 Relations Rf-Structure

La chromatographie sur papier permet non seulement d'identifier des composés déjà connus, mais également d'apporter des renseignements sur la structure des substances inconnues. Ceci exige la détermination des Rf de façon précise et il est alors nécessaire de respecter certaines conditions opératoires:

la température doit être maintenue constante à 1°C près;

le mélange solvant doit être agité et laissé au repos trois jours à la température d'emploi ;

enfin le papier doit être équilibré pendant 24 heures avec la vapeur du solvant.

BATE-SMITH (22) a ainsi établi les règles suivantes : dans le B.A.W.(4:1:5), pour les aglycones le  $R_f$  augmente quand le nombre des hydroxyles diminue ou par méthylation de ces hydroxyles. Les glycosides ont un  $R_f$  d'autant plus inférieur à celui des aglycones correspondants que le nombre des oses est plus élevé, mais la différence est moindre lorsque les oses sont fixés sur le même hydroxyle phénolique. Ces effets sont inversés dans les solvants essentiellement aqueux (eau, acide acétique 15 %).

HARBORNE (21) remarque de plus que les molécules d'aglycones à structure plane (flavones, flavonols, chalcones, aurones) ont des  $R_f$  nuls dans l'eau, alors que les molécules non planes (flavanones) ont des  $R_f$  positifs.

BATE-SMITH introduit en outre la notion de  $R_m$  défini par la relation :

$$R_m = \log\left(\frac{I}{R_f} - I\right)$$

et constate que si l'on porte cette variable en fonction du nombre des constituants de même nature (hydroxyles phénoliques ou sucres) sur un même corps de départ, on obtient une droite.

L'identification et la séparation des composés flavoniques sont donc possibles par la chromatographie sur papier qui cependant possède des limites. L'identification n'est en effet valable qu'à condition de posséder un échantillon de référence, d'opérer avec plusieurs systèmes de solvants différents et de s'assurer de l'identité d'autres propriétés physiques (spectre U.V. par exemple) ou chimiques.

Enfin la séparation, pour être efficace, doit porter sur de faibles quantités de produits.

### 1.2.3 Chromatographie sur colonne

Utilisée pour la séparation des composés flavoniques bien avant la chromatographie sur papier, la chromatographie sur colonne n'a cependant pas l'extension de celle-ci. Elle est en effet d'un emploi bien moins commode et aucune phase fixe n'a donné jusqu'à présent entière satisfaction. Elle présente cependant l'avantage de permettre l'isolement d'une plus grande quantité de produits; mais il est préférable d'utiliser un extrait déjà purifié, par précipitation à l'acétate de plomb par exemple, afin de partir d'un mélange moins complexe.

La poudre de cellulose a donné les meilleurs résultats pour les différents types de flavonoïdes. La purification de la cellulose commerciale est assez longue et exige de nombreuses opérations (32): lavages successifs à l'eau, à l'acide acétique 15 %, à nouveau à l'eau, puis à l'alcool absolu et à l'éther, suivis d'un séchage à 110°. Tous les types de solvants peuvent être employés pour le développement et l'élution de ces colonnes; en particulier on peut utiliser les mêmes solvants qu'en chromatographie sur papier (33).

Parmi les autres phases fixes utilisées, citons :

- l'acide silicique à l'aide duquel HOROWITZ et GENTILI(34) analysent les aglycones d'un extrait d'écorce de Citron commun,
- le magnésol (silicate acide de magnésium hydraté synthétique) très utilisé seul (35,36) ou en présence de Célite (37). Les glycosides sont en général plus adsorbés que les aglycones (38),
- les résines cationiques en particulier l'Amberlite IRC-50 (39),
- les poudres de polyamides, enfin, d'emploi assez récent et prometteur (40,41).

#### 1.2.4 Chromatographie en couche mince

Cette technique relativement récente et due à STAHL qui en a fait une mise au point en 1962 (42) a eu un succès extrêmement vif. Elle présente en effet de nombreux avantages dont le principal est certainement la rapidité des opérations. Elle permet en outre un choix de solvants très grand et grâce aux adsorbants mis actuellement à notre disposition, on peut séparer aussi bien les aglycones que les glycosides. Ceci est un avantage par rapport à la chromatographie sur papier, où les  $R_f$  des aglycones dans un solvant donné sont très proches.

Pour des renseignements théoriques ou pratiques sur la technique d'étalement des couches, sur le développement des chromatoplaques on pourra se rapporter à d'autres mises au point écrites ou traduites en français (43,44). Parmi les nombreux adsorbants possibles, ont été employés :

- le kieselgel G (avec liant) pour la vérification de pureté d'un aglycone, ou la comparaison avec un échantillon de référence. On peut le mélanger avec un sel comme l'acétate de sodium (45),
- le kieselgel H pour la chromatographie préparative,
- la poudre de polyamide pour les glycosides.

La révélation des pigments est ici encore très facile, à cause de leurs propriétés spectrales U.V. On peut aussi vaporiser sur la chromatoplaque les différents réactifs décrits pour la chromatographie sur papier. Notons en particulier, d'après notre expérience personnelle, la révélation des flavanones par le borohydrure de sodium et l'acide chlorhydrique.

Quant aux solvants, on peut en citer un grand nombre. Nous avons personnellement employé le système benzène-acétate d'éthyle, en faisant varier les proportions de l'ester.

Pour les aglycones, STAHL (45) préconise des systèmes plus complexes tels que toluène-formiate d'éthyle-acide formique (5:4:1) ou acétate d'éthyle-méthyl éthyl cétone-acide formique-eau (5:3:1:1). Signalons les travaux de DOHERTY, HAYNES et WHALLEY(46) sur les constituants de Digitalis lanata. Ils ont séparé les produits d'éthylation d'un extrait sur gel G avec le chloroforme comme solvant.

Pour les glycosides de flavonols, des solvants à base d'alcool dilué ont été essayés par EGGER (47) avec une couche mince de polyamide: eau-éthanol (2:3); eau-éthanol-acétylacétate d'éthyle (4:2:1) et eau-éthanol-méthyl éthyl cétone-acétylacétate d'éthyle (13:3:3:1). De ces expériences on peut tirer les conclusions suivantes :

- le Rf est indépendant de la nature du flavonol, mais dépend du nombre et de la position des sucres,
- tous les monosides-3 ont des Rf de 0,22 dans les deux premiers solvants,
- les biosides-3 ont des Rf légèrement supérieurs et la substitution de sucres sur deux hydroxyles différents provoque des migrations nettement plus grandes.

#### 1.2.5 Distribution à contre-courant

Le procédé de distribution à contre-courant est relativement peu employé dans l'analyse des mélanges flavoniques et ceci pour deux raisons :

- d'abord l'appareillage complexe qu'il exige,
- ensuite le choix d'un système de solvants convenable .

En effet cette technique consiste à réaliser la répartition d'un mélange entre deux phases liquides non miscibles. Son emploi étant moins répandu que les différents procédés de chroma-

tographie, nous en examinerons brièvement les bases théoriques.

#### 1.2.5.1 Théorie de la distribution à contre-courant selon le procédé de CRAIG

Considérons deux phases non miscibles et un soluté qui se répartit entre ces deux phases. Soit  $C_1$  sa concentration dans la phase supérieure et  $C_2$  sa concentration dans la phase inférieure. On définit un coefficient de partage  $k$  par la relation:

$$k = \frac{C_1}{C_2}$$

Ce coefficient, dit aussi de distribution, dépend d'un certain nombre de variables, en particulier des possibilités d'association intermoléculaire, ou de dissociation du soluté, de la concentration initiale, de la température. L'effet de la température est en fait assez faible, et si la solution est suffisamment diluée (solution idéale), on peut négliger l'influence de la concentration (48). Nous supposons pour simplifier que si l'on envisage un mélange de deux constituants, chacun se comporte indépendamment de l'autre; que l'on a une quantité unité de matériaux dissous et enfin que le volume des phases est égal.

Soit une substance A de coefficient de partage  $k$ , nous avons :

$$\begin{cases} C_1 + C_2 = 1 \\ k = \frac{C_1}{C_2} \end{cases} \quad (1)$$

d'où

$$\begin{cases} C_1 = \frac{k}{k+1} \\ C_2 = \frac{1}{k+1} \end{cases} \quad (2)$$

La séparation s'effectue dans une série de tubes numérotés de 0 à N, contenant tous un certain volume de phase inférieure. Le tube 0 contient en plus le même volume de phase supérieure et le produit est dissout dans les deux phases. Si l'on fait passer dans le tube 1, la phase supérieure de 0, la concentration totale dans ce tube sera :

$$C_1 = \frac{k}{k+1}$$

Le soluté se répartit entre les deux couches selon la même loi ; dans la couche inférieure nous aurons

$$\frac{k}{k+1} \times \frac{1}{k+1} = \frac{k}{(k+1)^2}$$

et dans la couche supérieure :

$$\frac{k}{k+1} \times \frac{k}{k+1} = \frac{k^2}{(k+1)^2}$$

Dans le tube 0 on ajoute de la phase supérieure fraîche; la concentration totale est celle de la couche inférieure résiduelle :

$$C_2 = \frac{1}{k+1}$$

Cette quantité de produit se répartit entre les deux phases :

$$\text{pour la phase inférieure : } \frac{1}{k+1} \times \frac{1}{k+1} = \frac{1}{(k+1)^2}$$

$$\text{pour la phase supérieure : } \frac{1}{k+1} \times \frac{k}{k+1} = \frac{k}{(k+1)^2}$$

Nous avons ainsi réalisé un transfert. Le second transfert s'effectue en faisant passer la couche supérieure de 1 dans le tube 2, la couche supérieure de 0 dans le tube 1 et en ajoutant de la

phase fraîche dans 0. Au bout de  $n$  transferts on a toujours d'après (1) et (2):

$$(C_1 + C_2)^n = 1$$

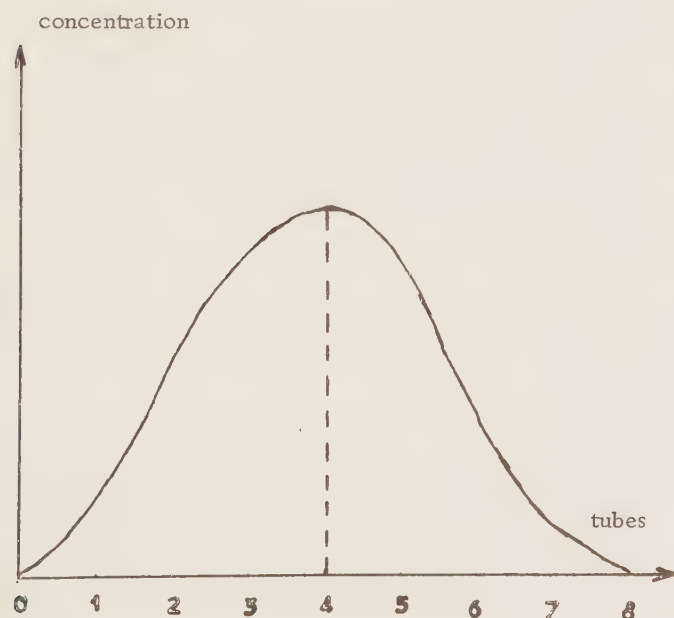
$$\left( \frac{k}{k+1} + \frac{1}{k+1} \right)^n = 1$$

Pour obtenir la concentration totale  $C_{n,r}$  dans un tube donné de rang  $r$ , il suffit de développer le binôme et on aura (49)

$$C_{n,r} = \frac{n!}{r!(n-r)!} \left( \frac{1}{k+1} \right)^n k^r \quad (3)$$

En portant en ordonnée une grandeur proportionnelle à la concentration et en abscisse le numéro des tubes, on obtient une courbe en cloche ayant l'allure suivante pour  $n = 8$  et pour  $k = 1$ .

La position du maximum est caractéristique de la substance dans les conditions données.



Cette technique peut être employée pour séparer des mélanges aussi bien que pour caractériser une substance. On peut déterminer si un produit est pur en comparant la courbe théorique avec celle obtenue expérimentalement (50). La courbe théorique se trace en déterminant  $k$  à partir de la position du maximum; si  $N$  est le numéro du tube correspondant à la plus forte concentration :

$$N = n \cdot \frac{k u}{k u + 1} \quad (4)$$

où  $u$  est le rapport du volume des phases.  $N$  n'est pas forcément un nombre entier, le maximum sur la courbe pouvant être situé entre deux tubes. De (4) on déduit  $k$  que l'on porte dans l'expression (3); on peut ainsi tracer une courbe point par point qui se superpose à la première si le produit est pur.

Dans le cas de l'analyse d'un mélange on obtient autant de pics que de constituants, et on peut également tracer une courbe théorique pour chacun (51).

L'aptitude de deux substances à se séparer est caractérisée par le rapport de leur coefficient de partage (52) :

$$\beta = \frac{k_A}{k_B}$$

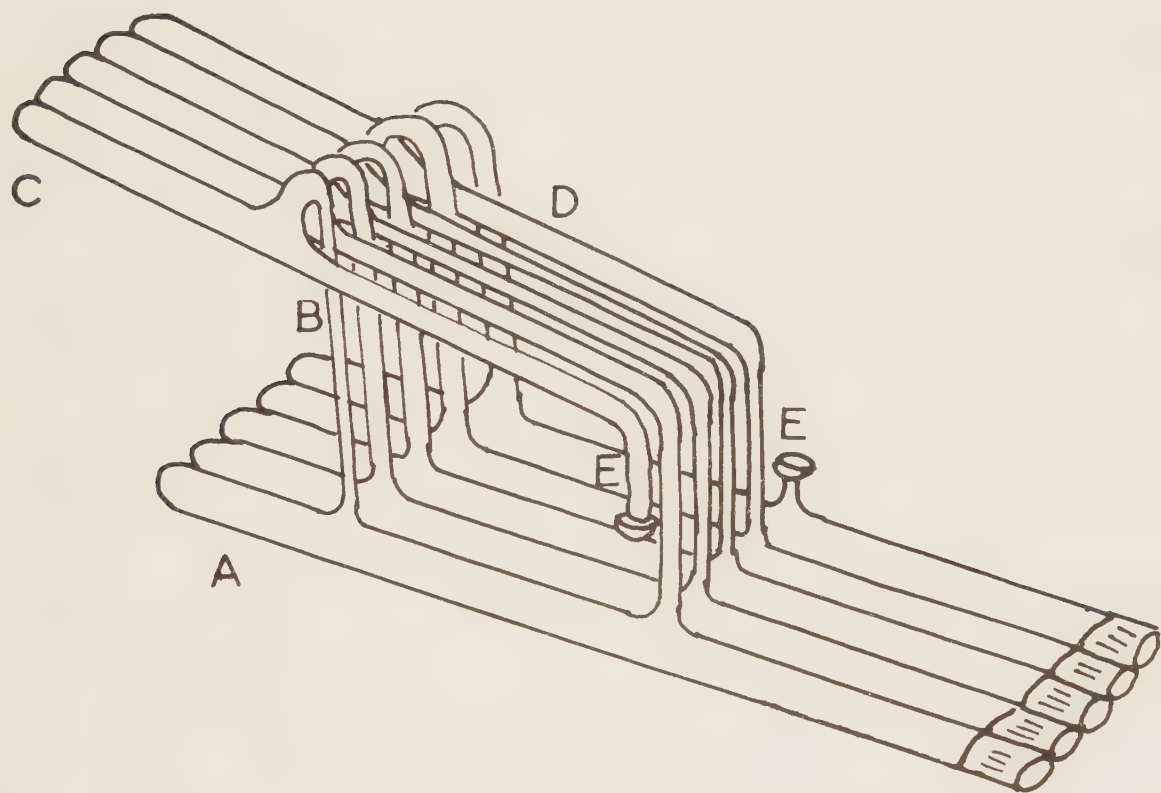
L'expérience montre que l'optimum de séparation est obtenu quand la moyenne géométrique des coefficients de partage est égale à 1.

#### 1.2.5.2 Appareillage

Pour effectuer un grand nombre de transferts (certaines opérations en nécessitent plusieurs centaines) on ne peut envisager d'employer des ampoules à décanter. Aussi L.C. CRAIG (53) a mis au point un appareil qui réalise les différentes étapes de façon entièrement automatique.

Autour d'un axe entraîné par un moteur est disposée une série de tubes dont le nombre peut être augmenté à volonté et qui ont la forme indiquée sur le schéma.

Le tube A contenant déjà la phase inférieure, la phase supérieure est introduite par E. Les tubes sont alors agités autour d'un axe horizontal. L'agitation cessant, les phases décan- tent et les tubes sont ensuite redressés verticalement.





La couche supérieure seulement passe à travers B dans l'ampoule C; ils sont à nouveau inclinés à  $35^\circ$  sous l'horizontale pour transférer la phase la plus légère dans le tube suivant à travers D.

On règle le temps d'agitation et de décantation. La phase supérieure est contenue dans un réservoir situé sous l'axe de rotation et un tube muni d'un trop-plein permet d'en isoler un volume connu à chaque transfert, et de le mettre en contact avec la phase inférieure du premier tube. Dans l'appareil que nous avons utilisé le nombre des tubes est de 120 répartis en deux batteries de 60 et le volume des phases est de 40 cm<sup>3</sup>.

Les deux phases étant équilibrées (54) (saturées l'une par rapport à l'autre), on introduit dans chaque tube 40 cm<sup>3</sup> de phase inférieure, la phase supérieure étant placée dans le réservoir. Les trois premiers tubes contiennent la solution à distribuer réparties entre les deux phases. Afin d'assurer une meilleure distribution, il est bon de placer dans les deux tubes suivants de la phase supérieure fraîche.

L'opération est alors effectuée :

- soit en arrêtant lorsque tous les tubes contiennent les deux phases,
- soit, ce stade étant atteint, en continuant à introduire la phase supérieure dans le premier tube et en recueillant le même volume à la sortie de l'appareil,
- soit encore, si la séparation paraît insuffisante, en recyclant le liquide par réunion du premier et du dernier tube.

#### 1.2.5.3 Applications aux composés flavoniques

L'application du procédé de CRAIG aux composés flavoniques est assez peu répandue car le choix des solvants est un problème qui se pose pour chaque cas particulier et il faut faire des études préalables assez longues pour être sûr d'obtenir le

meilleur résultat.

Cependant HÖRHAMMER(55) a essayé de déterminer le système de solvants d'après les valeurs des Rf en chromatographie sur papier. Le chromatogramme est développé par acétate d'éthyle-acide formique-eau (10:2:3) Pour des Rf inférieurs à 0,40 il préconise l'emploi d'acétate d'éthyle-n-butanol-eau(10:10:20). Pour des Rf compris entre 0,35 et 0,60 le système acétate d'éthyle-eau à pH 5 (1:1) semble meilleur alors que pour des Rf entre 0,50 et 0,80 ce serait éther-acétate d'éthyle-eau à pH 5 (5:1:5). Il isole ainsi un certain nombre de glycosides de Polygonum orientale ou de Nerium oleander (56).

D'autres auteurs emploient des solvants différents : D.G. ROUX (57) sépare la fustine (tétrahydroxy-3,7,3',4' flavanone) de la fisétine (tétrahydroxy-3,7,3',4' flavone) dans eau-butanol secondaire-benzène (5:3:2); de même TSCHESCHE utilise un solvant à base de butanol secondaire pour étudier un extrait des feuilles de Convallaria majalis (58). WEINGES effectue une distribution à contre-courant des composés flavoniques du coeur de bois de Rhus glabra entre l'éther et l'eau (59). On peut utiliser également des tampons pour les anthocyanes en particulier (60).

En conclusion, cette technique bien que présentant de nombreux avantages :

- excellente séparation si le mélange n'est pas trop complexe;
- récupération totale des produits;

- aucun matériau solide n'est introduit dans le mélange;

- emploi aussi bien pour l'analyse que pour l'identification;

cette technique donc est peu employée car elle nécessite un appareillage particulier et coûteux et d'autre part la recherche du solvant est souvent délicate.

### 1.3 Caractérisation et détermination des structures

Les procédés que nous venons d'étudier permettent donc de séparer les substances naturelles extraites, de vérifier leur pureté et dans certains cas de les caractériser. Si on ne peut les identifier ainsi, il faut d'abord s'assurer de leur nature flavonique, puis déterminer exactement leur structure. Des méthodes chimiques ou physiques permettent de résoudre ce problème sur de très faibles quantités de substances. Nous les examinerons successivement.

#### 1.3.1 Méthodes chimiques de caractérisation

##### 1.3.1.1 Réactions colorées

Outre l'emploi des réactifs déjà décrits pour la révélation des chromatogrammes, certains tests qualitatifs sont caractéristiques des composés flavoniques et donnent des colorations qui permettent de les classer.

L'un des plus employés est la réduction par le magnésium et l'acide chlorhydrique en solution alcoolique (61). On obtient des colorations allant du rouge au rouge-violet s'il y a des substituants sur le noyau B. Ce test est positif également avec certaines xanthones.

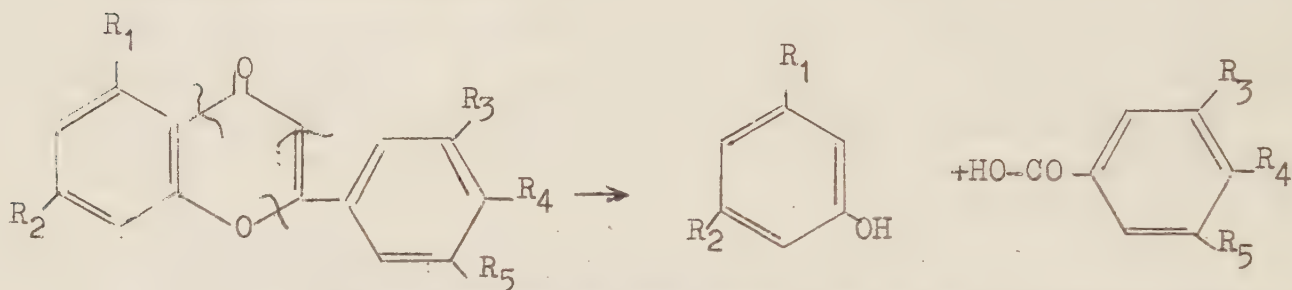
Si l'on remplace le magnésium par le zinc, ce test est caractéristique des flavanonols (62).

Ceux-ci donnent également des produits rouges par acétylation par l'anhydride acétique bouillant en présence d'acétate de sodium, suivie d'une hydrolyse par l'acide chlorhydrique (63, 64).

Certains acides forts: l'acide sulfurique (65), l'acide nitrique (66), ou une solution chloroformique de chlorure d'antimoine (67) dissolvent les flavonoïdes en donnant des colorations caractéristiques.

### 1.3.1.2 Dégradations alcalines

Nous n'exposerons que brièvement ces procédés car nous les avons peu employés au cours de notre travail. Le traitement alcalin conduit à des produits de coupure: polyphénols et acides benzoïques hydroxylés.



Il peut se faire par simple contact pendant quelques heures avec la potasse 50 %; en tube scellé à 170°C avec la soude alcoolique 30 % ou surtout par fusion vers 220°C pendant un temps très court avec la soude ou la potasse en pastilles. Cette dernière méthode surtout est utilisée car elle permet l'identification des produits de coupure par chromatographie sur papier (68). MENTZER et MAURICE (69) en utilisant des microquantités (quelques mg) de chrysine (dihydroxy-5,7 flavone) peuvent ainsi mettre en évidence la phloroglucine et l'acide benzoïque.

Les fusions alcalines peuvent conduire selon les conditions opératoires à des produits différents. C'est ainsi que PARIS (70) en essayant d'établir la structure du scoparoside (C-glycoside de la trihydroxy-5,7,4' méthoxy-3' flavone) obtient:

-à la température du bain-marie de la phloroglucine et de l'acétovanillone,

-pendant deux minutes à 240°C puis deux minutes à 280°C il y a apparition d'acide vanillique,

-pendant cinq minutes à 240°C et dix minutes à 280°C il se forme uniquement de la phloroglucine et de l'acide protocatéchique. Il y a donc eu déméthylation.

### 1.3.1.3 Hydrolyse des glycosides

L'étude des glycosides comprend leur hydrolyse de façon à séparer la partie sucre de reste de la molécule.

L'hydrolyse acide s'effectue avec l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique 2N pendant un temps variable selon la résistance du produit. L'hespéridine, par exemple, est très stable et n'est scindée par cette méthode qu'au bout de 80 heures (71). En général l'aglycone précipite ou est extrait à l'éther de la solution aqueuse; il peut alors être caractérisé par les méthodes décrites plus haut ou par son spectre U.V.

Les sucres sont identifiés, après neutralisation et déminéralisation de la solution aqueuse, par chromatographie. On emploie soit le passage sur une résine échangeuse d'ions, soit une solution à 10 % dans le chloroforme de di-n-octylméthylamine (72). Si l'on utilise l'acide sulfurique, on peut précipiter le sulfate de baryum en ajoutant la baryte en quantité juste suffisante.

L'hydrolyse enzymatique fait appel à des enzymes non spécifiques comme la rhamnodiastase (73) ou l'hémicellulase(34); ou encore à des enzymes spécifiques donnant des renseignements sur le mode de liaison des sucres comme la  $\beta$ -glucosidase.

## 1.4 Détermination des structures à l'aide des spectres d'absorption U.V.

Les composés flavoniques présentent des spectres U.V. d'absorption très caractéristiques de la classe (flavone ou flavanone) à laquelle ils appartiennent. De plus l'addition de certains réactifs provoque des modifications du spectre U.V., caractéristiques de la nature et de la position des substituants. Nous étudierons successivement les flavones et flavonols, les flavanones et les aurones.

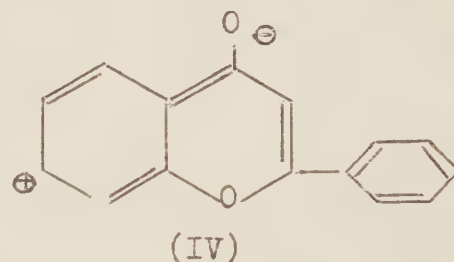
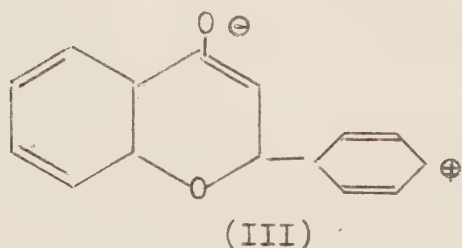
#### 1.4.1 Cas des flavones et des flavonols.

Ces composés présentent en absorption U.V. deux bandes :

la bande I située entre 320 et 380 m $\mu$

la bande II située entre 240 et 270 m $\mu$  .

JURD et HOROWITZ (74) suggèrent que les flavones ou flavonols présentent des formes limites du type cinnamoyle (III) ou benzoyle (IV) :

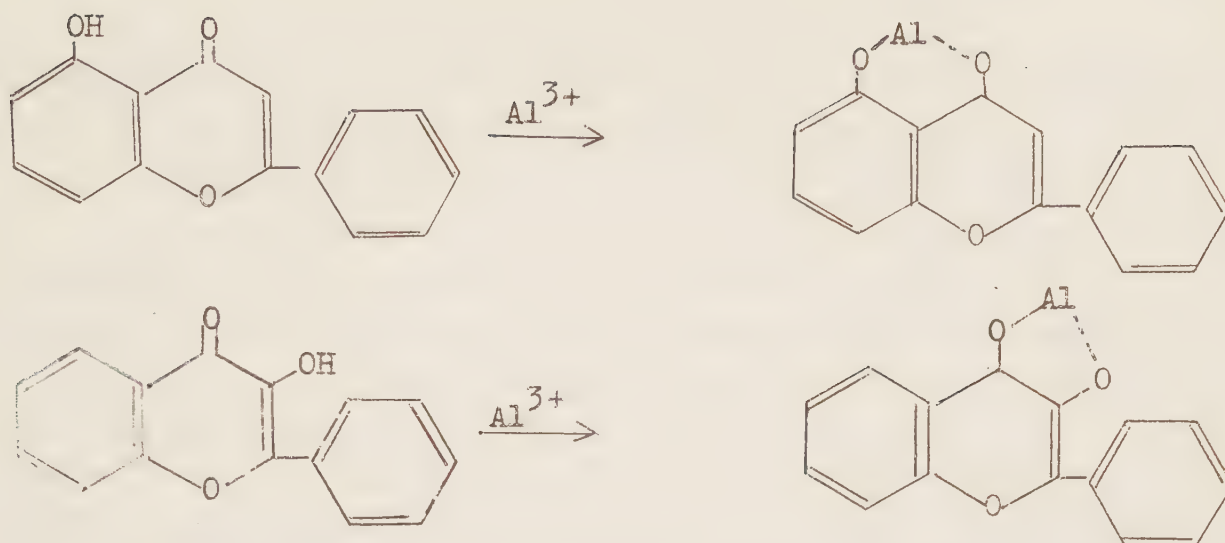


et que la bande I est attribuable à (III) alors que la bande II serait due à (IV). Si bien que les substituants introduits sur le noyau A ont une influence sur le maximum de courte longueur d'onde et ceux du noyau B sur le maximum de plus grande longueur d'onde.

En comparant les spectres U.V. d'un grand nombre de substances, on constate d'autre part que celles qui ont un seul substituant en 4' possèdent un pic bien défini entre 240 et 270 m $\mu$ , alors que celles disubstituées en 3' et 4' présentent soit deux pics, soit un seul pic et une inflexion (74).

Par l'emploi de certains réactifs on peut très rapidement et en utilisant peu de produit, détecter et localiser les groupements hydroxyles libres dans la molécule.

- le chlorure d'aluminium en solution éthanolique saturée forme un complexe avec les composés ayant un hydroxyle en 5 ou en 3 selon :



Chacun des pics du spectre initial se dédouble et donne deux pics ou inflexions Ia, Ib et IIa, IIb, avec un effet bathochrome. Dans le cas des hydroxy-5 flavones l'effet bathochrome entre I et Ia est de l'ordre de 20 à 45 m $\mu$ , pour les flavonols (hydroxy-3 flavone) il est d'environ 60 m $\mu$  (75,76,77).

On peut ainsi distinguer les flavonols dont l'hydroxyle en 3 est libre des glycosyloxy-3 flavones (78).

- l'acétate de sodium ionise les hydroxyles les plus fortement acides, c'est-à-dire en 7 et en 4'. La position 4' appartenant au noyau B, il y a un effet bathochrome sur la bande I, mais ceci n'est pas encore très étudié.

En ajoutant un peu d'acétate de sodium fondu à une solution alcoolique d'hydroxy-7 flavone ou flavonol, on observe un déplacement bathochrome de la bande II de 8 à 20 m $\mu$  (79)

- un autre réactif également très employé est une solution alcoolique d'éthylate de sodium 0,002M. SWAIN (80,81) le premier l'utilise pour montrer la structure de certains glycosides isolés de Dahlia variabilis. L'éthylate de sodium, étant beaucoup plus alcalin que l'acétate, ionise tous les groupements hydroxy-les quelle que soit leur position. Les bandes I et II présentent

toutes les deux un déplacement bathochrome; on peut indiquer:

- qu'un effet bathochrome de 50 à 60 m $\mu$  sur la bande I, sans diminution de son intensité relative, est en faveur d'un hydroxyle en 4',

- que pour une hydroxy-5 flavone, et si ce groupement est le seul libre dans la molécule, on a un effet de 20 m $\mu$  environ sur la bande II, alors que la bande I devient une inflexion,

- qu'enfin, d'après JURD et HOROWITZ (82) les flavonols contenant à la fois un hydroxyle libre en 3 et en 4' ne sont pas stables dans l'éthylate de sodium: la bande de grande longueur d'onde disparaît en quelques minutes.

- il est possible également de mettre en évidence la présence de groupes o-dihydroxylés. En présence d'acétate de sodium, l'acide borique forme des chélates avec les composés possédant cette structure, et il s'en suit un déplacement bathochrome de la bande I de 15 à 20 m $\mu$ .

Enfin d'après les travaux de GEISSMAN et HARBORNE (83) et de SWAIN (75), une solution alcoolique saturée de chlorure d'aluminium provoque un déplacement bathochrome de la bande I de 10 à 20 m $\mu$ .

#### 1.4.2 Cas des flavanones.

Dans ces composés le noyau B n'est pas conjugué avec le groupement carbonyle; il en résulte qu'ils présentent un seul maximum d'absorption vers 270-290 m $\mu$  (bande II) et que la bande I (vers 310-330 m $\mu$ ) est réduite à une inflexion.

Les mêmes réactifs peuvent être employés :

- le chlorure d'aluminium en solution alcoolique provoque un déplacement bathochrome de la bande II de l'ordre de 25 m $\mu$  pour les hydroxy-5 flavanones (74,84),

- l'acétate de sodium permet de déceler les hydroxy-7

flavanones (85),

- la détection des systèmes o-dihydroxylés se fait de façon identique,

- l'emploi de réactifs fortement alcalins peut provoquer une ouverture en chalcone, avec absorption vers 300-400 m $\mu$  . Cependant avec la soude 1 % l'ouverture ne se fait rapidement (5 à 10 minutes) que pour les flavanones possédant la structure hydroxy-4' alcoxy(ou glycosidoxy)-7 (85).

#### 1.4.3 Cas des aures.

Nous étudierons enfin les aures qui présentent un spectre U.V. beaucoup plus complexe, avec 3 ou 4 maxima, la bande principale étant située vers 350-430 m $\mu$  . Ici encore on peut employer des réactifs comme :

- le chlorure d'aluminium qui provoque un déplacement bathochrome de l'ordre de 60 m $\mu$  sur le maximum de plus grande longueur d'onde si l'hydroxyle en 4 est libre (76,83),

- l'éthylate de sodium provoque des déplacements importants sur cette même bande. En particulier si l'hydroxyle en 4' est libre, le déplacement peut atteindre 80 m $\mu$  . GEISSMAN et HARBORNE (83) montrent que pour la triméthoxy-4,3',4' hydroxy-6 aune, on a une variation de longueur d'onde de + 8 m $\mu$  , alors que pour la triméthoxy-4,6,3' hydroxy-4' aune, elle est de 85 m $\mu$  .

Des résultats exposés au cours de ce premier chapitre, nous avons déduit une méthode d'étude des composés flavoniques que nous avons appliquée aux extraits de l'écorce de Citron.

- 1) séparation et purification par chromatographie ou distribution à contre-courant;
- 2) essai de caractérisation par chromatographie;

- 3) étude des spectres U.V. dans différents milieux;
- 4) hydrolyse acide ou enzymatique;
- 5) caractérisation des sucres par chromatographie ;
- 6) identification des aglycones par chromatographie et par leur spectre U.V. dans différents milieux, ce qui permet de connaître la position des sucres par l'apparition de groupements hydroxyles libérés au cours de l'hydrolyse;
- 7) enfin, si le composé est inconnu, on peut utiliser les méthodes chimiques de dégradation ou de méthylation.

## CHAPITRE II

### COMPOSES FLAVONIQUES DE L'ECORCE DE CITRON

Les composés flavoniques du genre Citrus sont étudiés depuis quelques années en relation avec leur action physiologique (86). En effet RUSZNYAK et SZENT-GYORGYI (87) isolèrent de la peau du Citron un mélange de glycosides flavoniques appelé "citrine", actif sur la perméabilité et la résistance des capillaires sanguins. Cet extrait contient, d'après SZENT-GYORGYI (88,89) de l'hespéridine (rutinoside-7 de la trihydroxy-5,7,3' méthoxy 4' flavanone) et un glycoside d'ériodictyol (tétrahydroxy-5,7,3',4' flavanone) de structure exacte non déterminée. Nous avons vu précédemment que cet auteur proposa pour cet extrait le terme de vitamine r, qui ne semble plus devoir être retenu. D'autres extraits naturels, en particulier de raisins, ont une activité semblable (90). Les flavonoïdes isolés de cet extrait par WILLIAM et WENDER (35) sont la quercétine (pentahydroxy-3,5,7,3',4' flavone), son glucoside-3 ou isoquercitrine et son rutinoside-3 ou rutine. Ces composés ont tous des groupements ortho-dihydroxylés qui semblent donc responsables de l'activité "vitaminique". En fait LAVOLLAY a montré que des corps possédant d'autres structures avaient les mêmes propriétés (91).

Cependant ces dérivés o-diphénoliques ont suscité un nouvel intérêt à la suite des expériences de MASRI et de EDS qui ont montré, d'une part, qu'ils avaient une influence sur le développement du thymus (92) et, d'autre part, que l'ingestion de composés comme l'ériodictyol ou la quercétine par l'Homme condui-

sait à l'élimination urinaire des acides dihydroxy-3,4 phénylacétique, m-hydroxyphénylacétique et homovanillique (93). Dans l'organisme la dégradation de telles molécules s'accompagne donc d'une déshydroxylation et même d'une méthylation, ce qui a conduit certains auteurs (94) à suggérer que l'activité physiologique des flavonoïdes est due à leur aptitude à entrer en compétition avec l'adrénaline vis-à-vis de l'enzyme qui active ou désactive cette hormone.

## 2.1 Travaux antérieurs sur les flavonoïdes des Citrus

Malgré la grande diversité des variétés de Citrus, ces fruits renferment tous sensiblement les mêmes substances. Nous décrirons d'abord les flavanones, puis les flavones et enfin les flavonols qui sont les seuls types de flavonoïdes isolés jusqu'à présent.

### 2.1.1 Flavanones

Les glycosides de flavanones semblent particulièrement importants dans cette famille, et J.F. KEFFORD (95) a suggéré de les utiliser pour la taxonomie de l'espèce.

La naringine ou néohesperidoside-7 de la naringénine (trihydroxy-5,7,4' flavanone) est responsable du goût amer des Pamplemousses (Citrus decumana) (96) dont elle a été extraite en quantité importante (97,98,99), le meilleur solvant d'extraction paraissant être le pentanol (100).

Quelques autres variétés en contiennent: Citrus natsudaidai (101,102), Citrus médioglobora et Citrus hassaku (103). L'enchainement des sucres a été déterminé récemment par HOROWITZ et GENTILI (104) qui ont montré qu'il s'agissait de l' $\alpha(1 \rightarrow 2)$  ~~D-glucopyranosido D-rhamno~~<sup>D-glucosyl</sup>pyranose.

Un autre glycoside de flavanone, la poncirine, possède

le même enchainement des sucres. L'aglycone est l'isosakuranétine ou dihydroxy-5,7 méthoxy-4' flavanone, les sucres étant attachés en position 7. Cette substance a également été isolée du Pamplemousse (105) et de Citrus tachibana (103).

SOSA et SANNIE (106) signalent l'isolement du fruit vert de Citrus trifoliata d'un composé voisin - le citrofolioside - mais dont le sucre présenterait la structure du rutinose c'est-à-dire serait le  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  D-<sup>L. rhamnu</sup>glucopyranosido D-<sup>gluc</sup>rhamnopyranose.

La citronine (107) extraite de Citrus limonum var. Ponderosa par YAMAMOTO et OSHINA présente une structure rarement rencontrée: un substituant méthoxyle est en position 2'. L'aglycone est la citronétine ou dihydroxy-5,7 méthoxy-2' flavanone. Les sucres attachés en 7 sont glucose et rhamnose. Il a été isolé de Citrus sinensis par RAHMAN et KHAN (108).

L'hespéridine ou rutinosido-7 hespérétine (trihydroxy-5,7,3' méthoxy-4' flavanone) est une des substances flavoniques les plus anciennement connues. Elle a été isolée de l'Orange (Citrus aurantium) en 1828 par LEBRETON (109). HOFFMAN (110) isola l'aglycone, tandis que KING et ROBERTSON (111) déterminèrent la position des sucres dont la nature et l'enchainement exact furent connus seulement en 1959 (112). Le glycoside a été isolé surtout de Citrus aurantium (10,113,114), mais on le rencontre dans de nombreuses variétés: C.mitis, C.medica, C.sinensis (103,115,116, 117,118,119).

Le parallélisme qui existe dans l'enchainement des sucres pour le citrofolioside et la poncirine se retrouve dans la néohespéridosido-7 hespérétine ou néohespéridine dans Citrus grandis (116), dans C.ponderosa (120) et dans C.aurantium (113).

Le dernier glycoside de flavanone connu dans ces fruits est l'ériocitrine, l'un des constituants de la "citrine" et dont la structure fut démontrée par HOROWITZ (121). Ce rutinosido-7

ériodictyol (tétrahydroxy-5,7,3',4' flavanone) est le seul glycoside d'ériodictyol isolé jusqu'à présent. On ne connaît pas le néohespéridoside correspondant. Toutefois MAGER (122) signale l'isolement d'un rhamnosyl ériodictyol à partir de la "citrine".

Enfin ROW et SASTRY (123,124) décrivent deux flavanones aglycones fortement substituées de Citrus mitis Blanco : la citromitine (hexaméthoxy-5,6,7,8,3',4' flavanone) et la déméthyl-5-O-citromitine.

### 2.1.2 Flavones et flavonols

Les flavones et flavonols ont été isolés surtout sous forme d'aglycones. Parmi ceux-ci, nombreux sont ceux qui portent un grand nombre de substituants ce qui semble caractéristique de la famille des Rutacées.

La rhoifoline: rutinosido-7 apigénine(trihydroxy-5,7-4' flavone) (98,116) et la diosmine: rutinosido-7 diosmétine(trihydroxy-5,7,3' méthoxy-4' flavone) (7,116) sont les seuls glycosides de flavones connus dans cette famille.

La naringine et l'hespéridine ont exactement les mêmes schémas de substitution, ce qui est en accord avec le fait que l'on rencontre souvent dans la même plante, la flavone et la flavanone correspondantes.

Les autres flavones sont les aglycones extraits de Citrus limonum par HOROWITZ et GENTILI (34). Après hydrolyse enzymatique d'un extrait, la partie soluble dans l'acétate d'éthyle est passée sur colonne de silice et éluée par du chloroforme contenant des proportions croissantes d'acétone. Sont ainsi obtenus :

l'apigénine : trihydroxy-5,7,4' flavone

la lutéoline: tétrahydroxy-5,7,3',4' flavone

le chrysoériol: trihydroxy-5,7,4' méthoxy-3' flavone.

Des composés fortement substitués se rencontrent aussi: la ponkanétine (pentaméthoxy-5,6,7,8,4' flavone) (125,126,127) et surtout la nobilétine (hexaméthoxy-5,6,7,8,3',4' flavone) correspondant à la citromitine mais qui n'a pas été trouvée dans les mêmes variétés.

ROBINSON et TSENG(128,129) l'isolent la première fois de Citrus nobilis (mandarinier) et depuis elle a été isolée de Citrus tankan (130), de Citrus aurantium var. Valencia (131) et plus récemment de Citrus deliciosa var. Tenore (132) par extraction de l'écorce séchée à l'éther de pétrole.

SARIN et SESHADRI signalent l'existence de la déméthoxy-5-O nobilétine dans la peau de Citrus aurantium var. Nagpur (133).

Quant aux hydroxy-3 flavones, la rutine: rutinose-3 quercétine est le seul glycoside connu dans les Citrus (9). D'autre part HOROWITZ et GENTILI (34) décrivent l'isolement de Citrus limonum, après hydrolyse enzymatique, de la quercétine, de l'isorhamnétine (tétrahydroxy-3,5,7,4' méthoxy-3' flavone), de la limocitrine (tétrahydroxy-3,5,7,4' diméthoxy-8,3' flavone) et du limocitrol (tétrahydroxy-3,5,7,4' triméthoxy-6,8,3' flavone).

Enfin il existe des flavonols polyméthoxylés: la tangerétine (pentaméthoxy-3,5,6,7,4' flavone) dans Citrus nobilis var. deliciosa (134) et l'auranétine (pentaméthoxy-3,6,7,8,4' flavone) de l'écorce de Citrus aurantium (135). L'hydroxy-5 auranétine a également été extraite de Citrus aurantium (133).

Ayant décrit dans le chapitre précédent les techniques utilisées pour la séparation des composés flavoniques et les substances de ce type isolées dans la famille des Citrus, nous exposons maintenant les résultats que nous avons obtenus dans l'analyse des glycosides flavoniques de l'écorce de Citrus limonum.

FLAVANONES

|                                                              | Naringine | Poncirine | Citro-<br>folioside | Citronine | Hespéri-<br>dine | Néohespé-<br>ridine | Eriocitrine | Citromé-<br>tine | Déméthyl-<br>5 Citromé-<br>tine |
|--------------------------------------------------------------|-----------|-----------|---------------------|-----------|------------------|---------------------|-------------|------------------|---------------------------------|
| <i>C.nobilis</i><br>var. <i>deliciosa</i><br>(mandarinier)   |           |           |                     |           | X                |                     |             |                  |                                 |
| <i>C.aurantium</i><br>var. <i>amara</i><br>Orange amère      | X         |           |                     |           |                  |                     |             |                  |                                 |
| <i>C.aurantium</i><br>var. <i>dulcis</i>                     |           |           |                     |           | X                | X                   |             |                  |                                 |
| <i>C.aurantium</i><br>var. <i>decumana</i><br>(Pamplemousse) | X         | X         |                     |           |                  |                     |             |                  |                                 |
| <i>C.medica</i><br>var. <i>limonum</i>                       |           |           |                     | X         | X                | X                   | X           |                  |                                 |
| <i>C.grandis</i>                                             | X         |           |                     |           |                  | X                   |             |                  |                                 |
| <i>C.trifoliata</i>                                          |           |           | X                   |           |                  |                     |             |                  |                                 |
| <i>C.sinensis</i>                                            |           |           |                     | X         |                  |                     |             |                  |                                 |
| <i>C.natsudaidai</i>                                         | X         |           |                     |           |                  |                     |             |                  |                                 |
| <i>C.hassaku</i>                                             | X         |           |                     |           | X                |                     |             |                  |                                 |
| <i>C.junos</i>                                               |           |           |                     |           | X                |                     |             |                  |                                 |
| <i>C.igo</i>                                                 |           |           |                     |           | X                |                     |             |                  |                                 |
| <i>C.médioglobora</i>                                        | X         |           |                     |           | X                |                     |             |                  |                                 |
| <i>C.tachibana</i>                                           |           | X         |                     |           | X                |                     |             |                  |                                 |
| <i>C.mitis</i>                                               |           |           |                     |           | X                |                     |             | X                | X                               |

FLAVONES ET FLAVONOLS

|                         | C. Nobilis | C. aurantium<br>var. amara | C. aurantium<br>var. dulcis | C. aurantium<br>var. decumana | C. Medica<br>var. limonum | C. grandis | C. poonensis |
|-------------------------|------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------|------------|--------------|
| Rhoifoline              |            | X                          |                             |                               |                           | X          |              |
| Apigénine               |            |                            |                             |                               | X                         |            |              |
| Diosmétine              |            |                            |                             |                               | X                         | X          |              |
| Lutéoline               |            |                            |                             |                               | X                         |            |              |
| Chrysoériol             |            |                            |                             |                               | X                         |            |              |
| Ponkanétine             |            |                            |                             |                               |                           |            | X            |
| Nobilérine              | X          |                            | X                           |                               |                           |            |              |
| Rutine                  |            |                            |                             |                               | X                         |            |              |
| Tangéretine             | X          |                            |                             |                               |                           |            |              |
| Auranétine              |            |                            | X                           |                               |                           |            |              |
| Hydroxy-6<br>auranétine |            |                            | X                           |                               |                           |            |              |
| Quercétine              |            |                            |                             |                               | X                         |            |              |
| Isorhamnétine           |            |                            |                             |                               | X                         |            |              |
| Limocitrine             |            |                            |                             |                               | X                         |            |              |
| Limocitrol              |            |                            |                             |                               | X                         |            |              |

## 2.2 Extraction

Nous sommes partis d'un produit provenant d'une extraction par une solution alcaline hydroalcoolique de l'écorce séchée du Citron commun.

Cet extrait qui semble posséder des propriétés thérapeutiques intéressantes (136), se présente sous forme d'une poudre jaune d'où nous avons essayé d'isoler les glycosides flavoniques par différentes méthodes. Les progrès de l'extraction ont été suivis par chromatographie monodimensionnelle sur papier Whatman n°1 dans l'acide acétique 15 %.

### 2.2.1 Extraction aqueuse

Elle a été réalisée en deux parties:

#### a) extraction en milieu neutre

Environ 100 g de matière première sont chauffés 15 minutes au bain-marie tiède avec 500 cm<sup>3</sup> d'eau. La solution est centrifugée et le résidu solide est à nouveau extrait par 700 cm<sup>3</sup> d'eau distillée. 53 g du produit initial sont passés en solution.

La chromatographie indique :

un produit de Rf 0,10 environ apparaissant jaune brillant en U.V. et virant à l'orangé par exposition du chromatogramme aux vapeurs d'ammoniac. Cette réaction est en faveur d'un corps du type aurone ;

pour des valeurs de Rf comprises entre 0,40 et 0,60 une tache très étendue, noire en lumière U.V. et révélée en jaune par le borohydrure de potassium en solution dans l'isopropanol. Il s'agit sans doute de flavones ;

une tache bleu turquoise en U.V. de Rf 0,70 ;

et enfin une tache de même fluorescence de Rf 0,80. Le test au borohydrure de potassium suivi de vaporisation d'acide chlorhydrique gazeux permet de mettre en évidence une flavanone

dans cette région.

La solution aqueuse est ensuite extraite en continu par 900 cm<sup>3</sup> d'acétate d'éthyle pendant 90 heures. L'étude chromatographique de l'extrait dans les mêmes conditions montre les mêmes substances, la tache de Rf 0,10 semblant relativement moins importante; la solution aqueuse résiduelle ne contient plus le produit de Rf 0,70. L'acétate d'éthyle est évaporé à sec, le résidu repris dans l'alcool et l'on ajoute une solution hydroalcoolique d'acétate de plomb neutre. Il se forme un précipité jaune qui est centrifugé, lavé à l'eau et à l'alcool puis séché, poids : 1,7 g.

#### b) extraction en milieu acide

Après cette extraction, la solution aqueuse est acidifiée par 8 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique pour amener le pH à 1. Le résidu solide est mis en suspension dans cette solution et traité au bain-marie pendant 15 minutes à nouveau. La solution est centrifugée et filtrée sur une couche de celite 535 pour la clarifier; 40 g de substance environ sont passés en solution.

Enfin le liquide est soumis à une nouvelle extraction en continu par 500 cm<sup>3</sup> d'acétate d'éthyle pendant 50 heures. Par chromatographie on constate que le mélange est très simplifié : la solution aqueuse acide contient le produit de Rf 0,10 et la ou les flavanones (Rf 0,80); l'acétate d'éthyle ne contient plus que les flavanones.

Après évaporation à sec et reprise dans l'éthanol le traitement par l'acétate de plomb neutre donne 3,4 g d'un précipité jaune.

#### 2.2.2 Extraction par solvants organiques

Nous avons utilisé ici un extracteur Kumagawa où le solide à extraire - contenu dans une cartouche - est en contact

avec la vapeur du solvant; par conséquent l'extraction est plus efficace qu'avec des extracteurs du type Soxhlet. Nous avons essayé deux procédés :

a) extraction par l'acétate d'éthyle, puis par l'éthanol :

180 g de poudre placés dans la cartouche sont extraits par 740 cm<sup>3</sup> d'acétate d'éthyle saturé d'eau pendant 75 heures. La solution renfermant une gomme est décantée et l'insoluble lavé à l'acétate d'éthyle. Les solutions sont réunies, concentrées, reprises par l'éthanol 95° et précipitées à l'acétate de plomb neutre: on obtient environ 3 g d'un précipité jaune.

La gomme lavée à l'alcool donne une substance jaune (F : 249-254°) dont le spectre I.R. (dans K Br) est identique à celui de l'hespéridine.

La chromatoplaque sur couche de polyamide dans le système eau-éthanol-méthyléthylcétone-acétylacétone (13 : 3: 3: 1) confirme ce résultat.

Le résidu de cette extraction est traité dans le même appareil par 500 cm<sup>3</sup> d'éthanol pendant 30 heures. Il se forme toujours une gomme, la solution alcoolique est décantée, concentrée à 200 cm<sup>3</sup> et précipitée par l'acétate de plomb. On recueille 9,6 g d'un précipité rouge.

La gomme reprise par l'éthanol donne également de l'hespéridine. On récupère ainsi 1 g d'hespéridine au total.

La chromatographie dans l'acide acétique 15 % avant la précipitation au plomb montre que ces différents extraits renferment les mêmes produits que l'extraction aqueuse.

b) extraction par l'éthanol :

195 g de poudre sont extraits par 700 cm<sup>3</sup> d'éthanol pendant 75 heures.

Poids du résidu après extraction : 90 g.

La solution brune est décantée; le produit gommeux lavé à l'alcool donne 1,5 g d'hespéridine. Les phases alcooliques réunies sont concentrées à 200 cm<sup>3</sup> et additionnées d'une solution hydroalcoolique d'acétate neutre de plomb. Le précipité rouge formé pèse, après centrifugation, lavage et séchage, 17,3 g. Le filtrat est additionné d'ammoniaque pour amener le pH à 9. On ajoute de l'acétate de plomb et il se forme un précipité jaune pesant 25 g.

Nous avons finalement choisi ce mode d'extraction qui permet d'obtenir une quantité plus importante de substances précipitables à l'acétate de plomb en milieu neutre et parce que, d'autre part, aucun des autres procédés n'est apparu suffisamment sélectif.

Les deux précipités sont d'abord mis en suspension dans l'éthanol, un courant d'hydrogène sulfuré détruit les complexes et régénère les flavonoïdes à l'état libre. Le sulfure de plomb est filtré et la solution concentrée est reprise dans un solvant convenable pour permettre les séparations.

Nous appellerons A la fraction précipitable par l'acétate de plomb en milieu neutre, dont l'analyse a été réalisée par distribution à contre-courant puis par chromatographie préparative sur papier; et B la fraction précipitable par l'acétate de plomb en milieu alcalin, dont les constituants ont été séparés par chromatographie sur colonne de cellulose, puis sur papier.

## 2.3 Etude de fraction A

### 2.3.1 Distribution à contre-courant

Une condition nécessaire pour une bonne séparation d'un mélange étant que les substances se dissolvent également dans

les deux phases, nous avons d'abord recherché le meilleur solvant en utilisant des proportions variables d'acétate d'éthyle, de n-butanol et d'eau. Nous avons comparé les quantités de produits dissous par spectre U.V. et par pesée. Le tableau I résume les résultats obtenus :

TABLEAU I

| Volume des solvants |           |     | Volume des phases sur 40 ml au total |                  | Densité optique au maximum de plus courte longueur d'onde |                  | Poids des substances sur 25 mg |                  |
|---------------------|-----------|-----|--------------------------------------|------------------|-----------------------------------------------------------|------------------|--------------------------------|------------------|
| Acétate d'éthyle    | n-Butanol | eau | Phase supérieure                     | Phase inférieure | Phase supérieure                                          | Phase inférieure | Phase Supérieure               | Phase inférieure |
| 20                  | 0         | 20  | 20                                   | 20               |                                                           | 0                | 25                             | 0                |
| 18                  | 2         | 20  | 21                                   | 19               | 0,5                                                       | 0,7              | 18,6                           | 6,4              |
| 10                  | 10        | 20  | 19                                   | 21               |                                                           |                  | 22,5                           | 2,5              |
| 5                   | 15        | 20  | 18                                   | 22               | 0,55                                                      | 1                | 18,8                           | 6,1              |
| 0                   | 20        | 20  | 20                                   | 20               |                                                           |                  | 14                             | 11               |

Il apparaît donc que certains corps n'absorbent pas en U.V., les poids des produits récupérés n'étant pas en accord avec les valeurs des densités optiques. Nous avons finalement utilisé le système n-butanol-eau(1:1), dans lequel le poids de substances dissoutes dans chacune des phases est sensiblement le même.

La distribution a été réalisée dans l'appareil de CRAIG décrit au premier chapitre (volume des phases 40 cm<sup>3</sup>). Nous avons effectué 120 transferts. Le contenu de chaque tube est concentré,

repris par l'éthanol et examiné par chromatographie sur papier dans l'acide acétique 15 % et par spectre U.V. Le tableau II indique les résultats de cette étude.

TABLEAU II

| Numéros des tubes | $\lambda$ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$<br>max<br>m $\mu$ | Rf                                   | Coloration                     |
|-------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| 1                 | 278                                                         | 0,90                                 | bleu                           |
| 10                | 278                                                         | 0,90                                 | —                              |
| 20                | —                                                           | —                                    | —                              |
| 30                | —                                                           | —                                    | —                              |
| 40                | ne contient pas de produits.                                |                                      |                                |
| 42                | 260, 275, 325                                               | 0,10<br>0,50<br>0,90                 | jaune<br>noir<br>bleu          |
| 50                | 265, 280, 325                                               | 0,10<br>0,50<br>0,90                 |                                |
| 60                | 266, 275, 330                                               | —                                    |                                |
| 62                | 275, 330                                                    | 0,10<br>0,30<br>0,50<br>0,90         | jaune<br>jaune<br>noir<br>bleu |
| 72                | 278, 328                                                    | 0,10<br>0,30<br>0,50<br>0,90         |                                |
| 73                | 281, 325                                                    | 0,05<br>0,10<br>0,30<br>0,50<br>0,90 |                                |
| 80                | 283, 325                                                    | —                                    |                                |
| 81                | 285, 325, 405                                               | —                                    |                                |

suite Tableau II

| Numéros des tubes | $\lambda_{\text{max}}^{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$<br>m $\mu$ | Rf                                           | Coloration |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------|
| 90                | 283,320,405                                                       | -                                            |            |
| 99                | 260,273,320                                                       | 0,05<br>0,10<br>0,30<br>0,40<br>0,50<br>0,90 | noir       |
| 100               | 260,273,320                                                       | -                                            |            |
| 107               | (260),270,320                                                     | -                                            |            |
| 109               | 315                                                               | -                                            |            |
| 110               | 315                                                               | -                                            |            |
| 120               | pas de produits révélables.                                       |                                              |            |

(entre parenthèses, les points d'inflexion)

Ceci nous a amené à regrouper les tubes en 7 fractions:

Fraction n°1: tubes 1 à 40 inclus  
 Fraction n°2: " 41 à 61 "  
 Fraction n°3: " 62 à 72 "  
 Fraction n°4: " 73 à 80 "  
 Fraction n°5: " 81 à 98 "  
 Fraction n°6: " 99 à 108 "  
 Fraction n°7: " 109 à 120 "

Les chromatogrammes bidimensionnels dans l'acide acétique 15 % puis dans le système n-butanol-eau-acide acétique(4:1:5) ont permis de vérifier le nombre de substances présentes dans chacune de ces fractions :

|              | Rf dans l'acide<br>acétique 15 %                 | Rf dans le<br>B.A.W.(4:1:5)                                                                    | Couleur en<br>U.V.                                              |
|--------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Fraction n°1 | 0,15<br>0,50<br>0,90                             | 0,35<br>0,40<br>0,80                                                                           | jaune<br>noir<br>bleu                                           |
| Fraction n°2 | 0,13<br>0,45<br>0,90                             | 0,33<br>0,42<br>0,80                                                                           | jaune<br>noir<br>bleu                                           |
| Fraction n°3 | 0,03<br>0,13<br>0,50<br>0,62<br>0,90             | 0,22<br>0,35<br>0,44<br><br>0,80                                                               | jaune<br>jaune<br>noir<br>noir<br>bleu                          |
| Fraction n°4 | 0,05<br><br>0,17<br><br>0,30<br>0,85             | ( 0,25<br>( 0,53<br><br>( 0,35<br>( 0,60<br><br>0,45<br>0,80                                   | jaune<br>jaune<br><br>jaune<br>jaune<br><br>jaune<br>bleu       |
| Fraction n°5 | 0,07<br><br>0,18<br><br>0,32<br>0,70<br>0,83     | ( 0,22<br>( 0,50<br><br>( 0,37<br>( 0,40<br>( 0,50<br><br>0,45<br><br>( 0,58<br>( 0,67<br>0,80 | jaune<br><br><br><br>jaune<br><br>jaune<br><br>noir<br><br>bleu |
| Fraction n°6 | 0,05<br><br>0,15<br>0,25<br>0,45<br>0,70<br>0,90 | ( 0,25<br>( 0,50<br><br>0,35<br>0,50<br>0,66<br>0,75<br>0,50                                   | jaune<br><br>jaune<br>jaune<br>noir<br>noir<br>bleu             |

|              | Rf dans l'acide<br>acétique 15 % | Rf dans le<br>B.A.W. (4:1:5) | Couleur en<br>U.V. |
|--------------|----------------------------------|------------------------------|--------------------|
| Fraction n°7 | 0,05                             | ( 0,25<br>0,55               | jaune              |
|              | 0,16                             | ( 0,34<br>0,56               | jaune              |
|              | 0,28                             | 0,50                         | jaune              |
|              | 0,36                             | 0,60                         | noir               |
|              | 0,45                             | 0,70                         | noir               |
|              | 0,51                             | ( 0,83<br>0,95               | noir               |
|              | 0,69                             | 0,87                         | noir               |

On constate que les fractions 2,4,5 et 6 sont les plus riches en composés flavoniques, les autres apparaissent peu importantes et la fraction 7 encore trop complexe. Ce sont donc les solutions 2,4,5 et 6 que nous avons analysées par chromatographie sur papier Arches 310 dans l'acide acétique 15 %.

### 2.3.2 Chromatographie préparative et identification des composés.

Nous avons commencé par étudier la fraction n°6 qui nous a paru la plus intéressante.

#### 2.3.2.1 Etude de la fraction n°6

En chromatographie préparative dans l'acide acétique 15 % il apparaît 6 bandes principales, par Rf croissants et avec indication de la fluorescence en U.V. :

|      |                |
|------|----------------|
| 0,05 | jaune vert     |
| 0,10 | jaune brillant |
| 0,30 | "              |
| 0,40 | noir           |
| 0,60 | "              |
| 0,80 | bleu           |

Pour pouvoir repérer ces bandes nous les désignerons par la suite - de même d'ailleurs pour les autres fractions - par le numéro de la fraction correspondante suivie du Rf dans l'acide acétique 15 %. Par exemple la bande bleu de Rf 0,80 de la fraction 6 sera C.6-0,80.

Les bandes sont découpées, éluées par l'éthanol 50 %. Les solutions obtenues sont concentrées puis lyophilisées lorsque l'alcool a été chassé.

#### C.6-0,80

Les poids de substances indiqués sont obtenus sur une extraction à partir de 195 g de produit de départ. Cette bande donne 60 mg d'un solide jaune après lyophilisation.

En chromatographie sur papier elle est apparemment homogène.

Valeur des Rf dans différents solvants:

| Solvants | Acide acétique<br>15 % | B.A.W.<br>(4:1:5) | Acide acétique<br>60 % |
|----------|------------------------|-------------------|------------------------|
| Rf       | 0,80                   | 0,95              | 0,86                   |

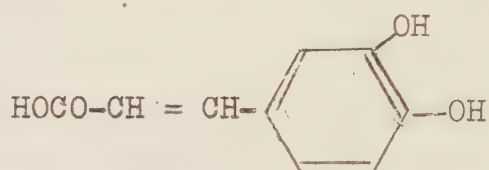
En couche mince sur gel de silice G dans le système benzène-dioxane-acide acétique (90:25:4) il apparait deux taches de Rf 0,28 et 0,77.

La solution étherée du mélange est extraite par une solution saturée de bicarbonate de sodium. La phase aqueuse est acidifiée et réextraite à l'éther. La chromatoplaque - dans le même solvant - montre que le produit de Rf 0,28 est soluble dans le bicarbonate. Il s'agit d'un acide hydroxylé comme le montre la réduction du nitrate d'argent ammoniacal.

Les spectres U.V. dans différents milieux sont indiqués ci-après :

|                              | $C_2H_5OH$ | $C_2H_5OH$<br>+ $CH_3COONa$ | $C_2H_5OH$<br>+ $C_2H_5ONa$ 0,002 M |
|------------------------------|------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| $\lambda_{max}$<br>en $m\mu$ | 299,326    | 287,315                     | 303,347                             |

D'après les travaux de JURD (137) nous pouvons passer à l'acide cafféique :



La chromatoplaque sur gel de silice permet d'identifier les deux composés en utilisant comme solvant benzène-dioxane-acide acétique (90:25:4) et benzène-acétate d'éthyle (4:1)  $R_f$  0,16

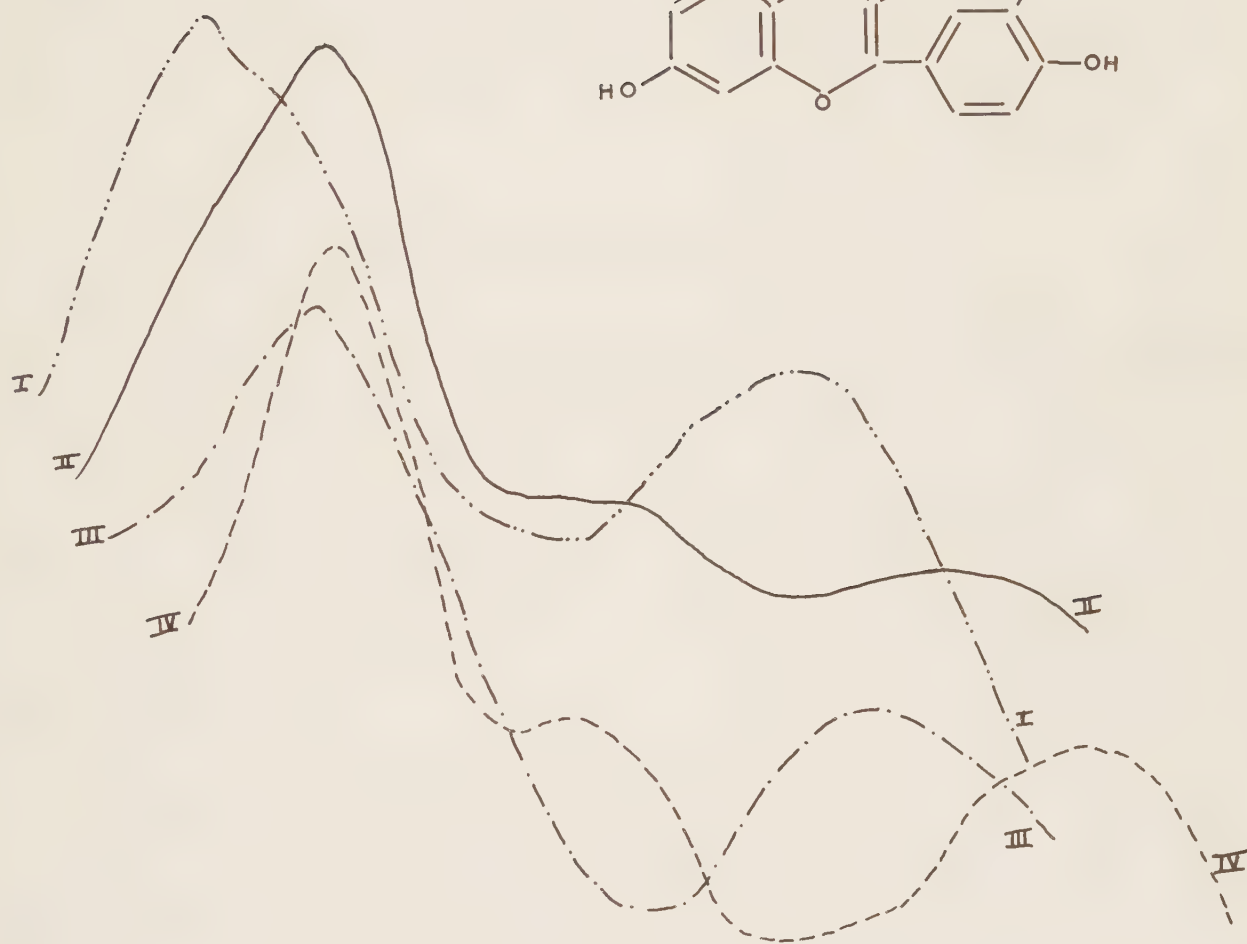
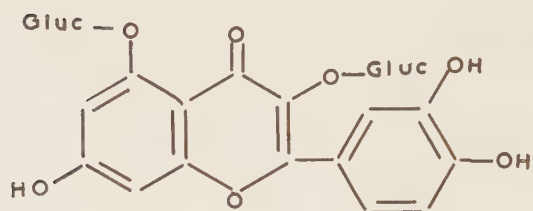
La substance insoluble dans le bicarbonate est reprise dans l'alcool après évaporation de l'éther. On peut facilement la recrystalliser de ce solvant (F:132-133°C) (50 mg). Elle ne présente pas de spectre U.V., mais le spectre I.R. (dans le KBr) est très proche de celui d'un stérol ou d'un terpène. En plus ce corps donne des résultats positifs avec les tests de LIEBERMAN (action de l'anhydride acétique et de l'acide sulfurique sur une solution chloroformique) et de SALKOWSKI (action de l'acide sulfurique seul sur une solution chloroformique). Plusieurs auteurs ont isolé un D-glucoside du  $\beta$ -sitostérol: SWIFT (138) à partir du Citrus sinensis et ROW et SASTRY du Citrus mitis Blanco (139).

Aussi avons-nous comparé le composé et le  $\beta$ -sitostérol: les spectres I.R. sont identiques, il n'y a pas abaissement du point de fusion par mélange et enfin les chromatoplaques montrent qu'il s'agit bien du même corps. Celles-ci ont été réalisées dans différents solvants:

chlorure de méthylène-méthanol-formiate d'ammonium (80:19:1)  
 $R_f = 0,90$

E

## Diglucosido-3,5 Quercetine



- I -  $C_2H_5OH$        $\lambda_{max}$  : 262, (267), 353 m $\mu$   
 II -  $C_2H_5OH + CH_3COONa$        $\Delta\lambda_{II}$  : 20 m $\mu$   
 III -  $C_2H_5OH + AlCl_3$        $\Delta\lambda_I$  : 11 m $\mu$   
 IV -  $C_2H_5OH + C_2H_5ONa$        $\Delta\lambda_I$  : 47 m $\mu$

220      270      320      370      420

λ m $\mu$



chloroforme-acétone (4:1)

R<sub>f</sub> = 0,84

benzène-acétate d'éthyle (4:1)

R<sub>f</sub> = 0,63

et révélées par une solution alcoolique à 2 % de p-hydroxybenzal-déhyde avec 1 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique concentré, suivi d'un séchage à 110°C. Les stérols donnent alors une coloration bleue

C.6-0,60

Poids: 33 mg

R<sub>f</sub> dans différents solvants :

| Solvants       | eau  | acide acétique<br>15 % | acide acétique<br>60 % | B.A.W.(4:1:5) |
|----------------|------|------------------------|------------------------|---------------|
| R <sub>f</sub> | 0,25 | 0,60                   | 0,73                   | 0,59          |

Sur couche mince de polyamide R<sub>f</sub> = 0,62 dans eau-éthanol(2:3).

Il donne une coloration rose en solution alcoolique par réduction avec le magnésium et l'acide chlorhydrique.

Spectres U.V.

|                            | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH<br>+ CH <sub>3</sub> COONa | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH<br>+AlCl <sub>3</sub> | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH<br>+ C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ONa 0,002M |
|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| λ <sub>max</sub><br>en m/μ | 262,(267),353                    | 282,360                                                     | 278,364                                                | 280,310,400                                                                    |

Ce spectre est celui d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3, appartenant vraisemblablement à la série phloroglucique à cause de la position du premier maximum vers 270 m/μ ; en série résorcylique celui-ci est en effet situé généralement vers 240-250 m/μ (140).

Dans l'acétate de sodium il y a un effet bathochrome de 20 m/ $\mu$  sur la bande II: l'hydroxyle en 7 est libre.

Dans le chlorure d'aluminium: effet de 11 m/ $\mu$  seulement. D'après les travaux déjà cités de GEISSMAN (83) et de SWAIN (75), ce déplacement peut être attribué au groupement des deux hydroxyles ortho, puisque ce corps est précipité par l'acétate de plomb neutre, (il donne un précipité jaune). La position 5 paraît donc bloquée d'autant plus qu'il n'y a pas dédoublement des pics.

Dans l'éthylate de sodium, la bande I est déplacée vers les grandes longueurs d'onde de 47 m/ $\mu$  et le spectre est conservé. La position 4' étant certainement libre (déplacement de +7 m/ $\mu$  de la bande I dans l'acétate de sodium), la position 3 s'il s'agit d'un flavonol est bloquée.

L'hydrolyse acide par l'acide chlorhydrique 2N pendant une demi-heure conduit à la quercétine extraite à l'éther et identifiée par spectre U.V. ( $\lambda_{\max}^{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$ : 257,371 m/ $\mu$ ) et par chromatographie.

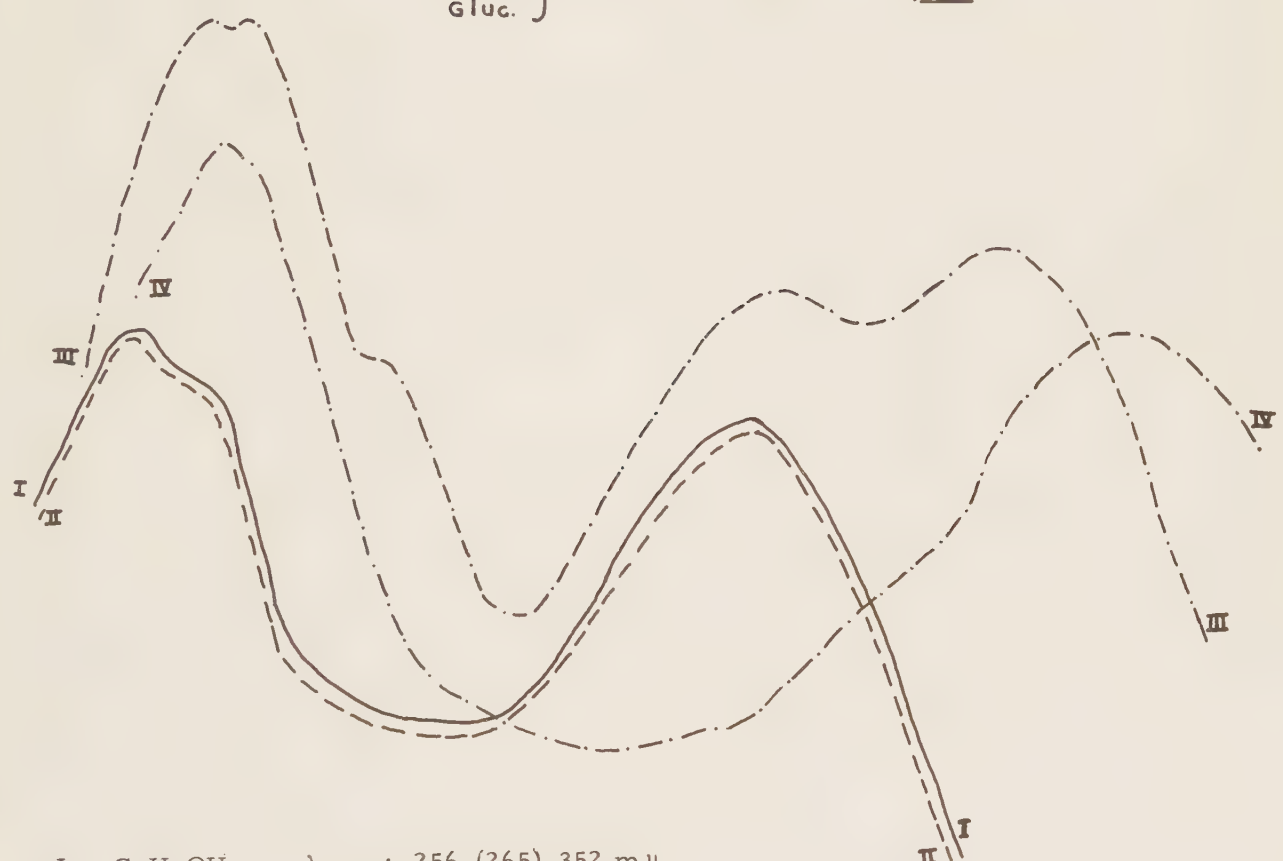
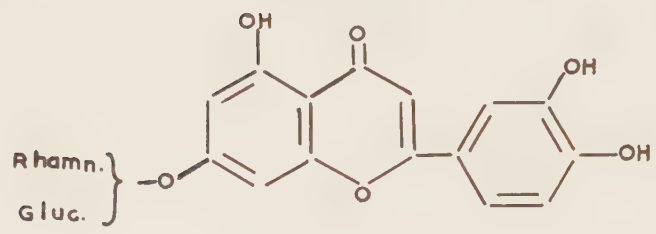
La phase aqueuse, après passage sur Amberlite IR-4B pour éliminer l'acide, et concentration, donne en chromatographie uniquement du glucose: Rf 0,40 dans le phénol saturé d'eau et 0,20 dans le B.A.W.(4:1:5).

Si l'on compare les déplacements dans le chlorure d'aluminium des glycosides-3 de la quercétine (141) avec celui obtenu dans ce cas :

|                |   | $\Delta \lambda_I$ |
|----------------|---|--------------------|
| C6-O,60        |   | 11 m/ $\mu$        |
| glucoside-3    | } | 44 m/ $\mu$        |
| isoquercitrine |   |                    |
| rhamnoside-3   | } | 49 m/ $\mu$        |
| quercitrine    |   |                    |
| galactoside-3  | } | 43 m/ $\mu$        |
| hypéroside     |   |                    |
| rutinoside-3   | } | 41 m/ $\mu$        |
| rutine         |   |                    |

E

Rhamnoglucosido-7 Lutéoline  
LONICERINE

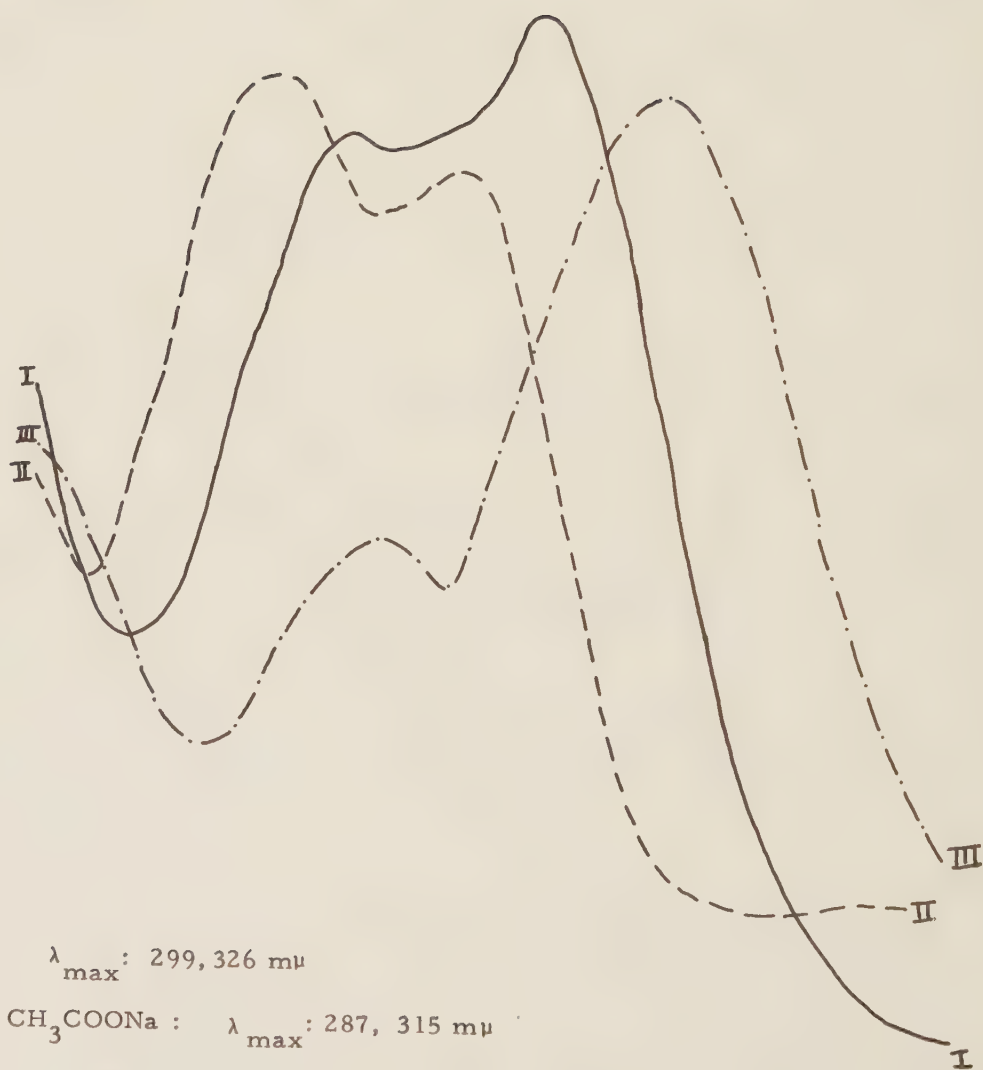
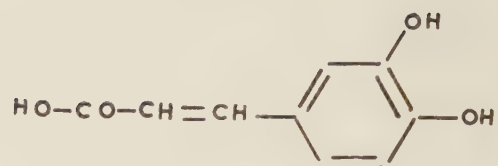


- I -  $C_2H_5OH$   $\lambda_{max}$  : 256, (265), 352 m $\mu$
- II -  $C_2H_5OH + CH_3COONa$
- III -  $C_2H_5OH + AlCl_3$   $\Delta\lambda_{Ia}$  -3 m $\mu$   $\Delta\lambda_{Ib}$  :39 m $\mu$
- IV -  $C_2H_5OH + C_2H_5ONa$   $\Delta\lambda_{II}$  :14 m $\mu$   $\Delta\lambda_I$  - 58 m $\mu$

230 250 300 350 400 430  $\lambda m\mu$

E

## ACIDE CAFFEIQUE



I -  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$   $\lambda_{\text{max}}$ : 299, 326  $\mu$

II -  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{CH}_3\text{COONa}$  :  $\lambda_{\text{max}}$ : 287, 315  $\mu$

III -  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{C}_2\text{H}_5\text{ONa}$   $\lambda_{\text{max}}$ : 303, 347  $\mu$

200

250

300

350

 $\lambda \text{ m } \mu$ 

400

on constate une différence considérable de  $\Delta\lambda_I$  qui confirme l'hypothèse précédemment émise du blocage de l'hydroxyle en 5.

Le Rf élevé en chromatographie plaque est également en faveur d'une disubstitution en 3,5 et enfin l'hydrolyse pendant 5 minutes laisse apparaître des traces d'isoquercitrine, révélée sur couche mince de polyamide.

Il s'agit donc certainement de la diglucosido-3,5 quercétine qui n'avait jamais été signalée à notre connaissance.

C.6-0,40

Poids 35 mg environ

Valeurs des Rf

| Solvants | Eau  | Acide acétique<br>15 % | Acide acétique<br>60 % | B.A.W.<br>(4:1:5) |
|----------|------|------------------------|------------------------|-------------------|
| Rf       | 0,08 | 0,40                   | 0,70                   | 0,47              |

Spectres U.V.

|                                | $C_2H_5OH$  | $C_2H_5OH$<br>+ $CH_3COONa$ | $C_2H_5OH$<br>+ $AlCl_3$ | $C_2H_5OH$<br>+ $C_2H_5ONa$ 0,002M |
|--------------------------------|-------------|-----------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| $\lambda_{max}$<br>en m/ $\mu$ | 256(265)352 | 256(265)360                 | 268,272(295)355,393      | 271(300)410                        |

Ce composé appartient donc également à la série des flavones phlorogluciques.

Seule la bande I se déplace dans l'acétate de sodium: l'hydroxyle en 7 est bloqué et, s'il existe, celui en 4' est libre. L'hydroxyle en 5 est également libre comme le montre le déplacement dans le chlorure d'aluminium. Enfin le simple effet bathochrome observé dans l'éthylate de sodium est en faveur d'un glycoside de flavone.

L'hydrolyse acide durant une heure avec l'acide chlorhydrique 2N libère l'aglycone qui est facilement identifié à la lutéoline. Nous avons donc un glycoside-7 de lutéoline.

Les sucres sont chromatographiés sur papier Whatman n°1 après passage de la solution résiduelle de l'hydrolyse sur une colonne d'Amberlite IR-4B; on caractérise dans le B.A.W.(4:1:5) et le phénol saturé d'eau le glucose (Rf 0,19 et 0,38) et le rhamnose (Rf 0,37 et 0,60).

Pour déterminer la proportion relative des sucres, nous opérons de la façon suivante: le chromatogramme (dans le B.A.W.) est révélé au phtalate d'aniline pour obtenir des taches visibles en lumière ordinaire; les sucres se révèlent en brun. On utilise un lecteur photométrique de bandes, avec un filtre rouge (Titromatic QUERE, Antarès, BORDEAUX). L'appareil est étalonné en utilisant les sucres libérés au cours de l'hydrolyse acide de la rutine qui donne une molécule de glucose pour une molécule de rhamnose. Dans les deux cas on obtient une courbe d'absorption présentant deux maxima dont le rapport des surfaces (déterminé par découpage et pesée) est proportionnel au rapport des quantités de sucres.

Dans le glycoside de lutéoline isolé ils sont dans le même rapport que dans la rutine: exactement un glucose pour 0,90 rhamnose.

Nous avons donc en 7 une molécule de glucose et une molécule de rhamnose, mais nous n'avons pu déterminer l'enchaînement.

Signalons simplement que nous avons comparé cette substance à un échantillon de Lonicérine (rhamnoglucoside-7 lutéoline) isolée récemment des feuilles de Lonicera japonica par NAKAOKI, MORITA et ISETANI (142). Bien que les spectres I.R. des deux substances ne soient pas très bien définis, nous en avons montré l'identité par chromatographie plaque dans eau-éthanol (2:3) (Rf 0,61); eau-éthanol-méthyl éthylcétone-acétylacétone

(13:3:3:1) (Rf 0,67) et dans acétate d'éthyle-méthyl éthyl-cétone-acide formique-eau (5:3:1:1) (Rf 0,74).

C.6-0,30; C.6-0,15 et C.6-0,05

Nous étudierons les produits élués à partir de ces bandes avec la fraction n°5 où ils sont plus abondants. Ils se retrouvent en effet dans toutes les fractions étudiées mais en quantité beaucoup plus importante dans la cinquième.

2.3.2.2 Etude de la fraction n°5

Par chromatographie préparative dans l'acide acétique 15 % on observe cinq bandes principales:

0,05 jaune vert  
0,10 jaune brillant  
0,30 jaune brillant  
0,58 noir  
0,82 noir

C.5-0,82

Ce composé est après l'hespéridine, le plus abondant dans cet extrait. Nous en avons isolé 300 mg.

La révélation du chromatogramme par une solution de borohydrure de sodium dans l'isopropanol suivie d'une exposition à l'acide chlorhydrique gazeux permet déjà de classer cette substance parmi les flavanones.

Valeurs des Rf

| Solvants | eau  | acide acétique<br>10 % | acide acétique<br>60 % | B.A.W.<br>(4:1:5) |
|----------|------|------------------------|------------------------|-------------------|
| Rf       | 0,60 | 0,71                   | 0,81                   | 0,50              |

## Spectres U.V.

|                               | $C_2H_5OH$ | $C_2H_5OH$<br>+ $CH_3COONa$ | $C_2H_5OH$<br>+ $AlCl_3$ | $C_2H_5OH$<br>+ $NaOH$ 1 % |
|-------------------------------|------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| $\lambda_{max}$<br>en m $\mu$ | 287(325)   | 287(330)                    | 295(345)                 | 290(365)                   |

Le spectre dans l'alcool est bien celui d'une flavanone. L'action de la soude 1 % provoque l'ouverture en chalcone au bout de quelques minutes: hydroxyle libre en 4', mais bloqué en 7, comme on peut également le constater avec le spectre en présence d'acétate de sodium. Enfin l'hydroxyle en 5 est libre car il y a un déplacement de +8 m $\mu$  avec le chlorure d'aluminium.

On peut donc déjà envisager un glycoside d'ériodictyol.

## Hydrolyse:

L'hydrolyse acide pendant trois quarts d'heure avec l'acide chlorhydrique 2N permet d'isoler l'aglycone après extraction à l'éther et l'acétate d'éthyle. La phase organique est concentrée et reprise par l'alcool. Les spectres U.V. de l'aglycone sont alors :

|                               | $C_2H_5OH$ | $C_2H_5OH$<br>+ $CH_3COONa$ | $C_2H_5OH$<br>+ $AlCl_3$ | $C_2H_5OH$<br>+ $NaOH$ 1 % |
|-------------------------------|------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| $\lambda_{max}$<br>en m $\mu$ | 288(330)   | 289(330)                    | 296(350)                 | (295) 340                  |

La position 7 est libérée.

D'autre part la chromatographie avec un témoin d'ériodictyol dans le B.A.W. (4:1:5) (0,85) le phénol saturé d'eau (0,89) et l'acide acétique 30 % (0,56) ne montre pas de différence entre les

deux corps.

Les sucres obtenus au cours de l'hydrolyse sont glucose et rhamnose dans les proportions de 1:1. Ils ont été dosés après révélation au phtalate d'aniline selon la même technique que précédemment (comparaison avec les sucres libérés par hydrolyse de la rutine).

La comparaison avec le Rf indiqué par HOROWITZ (121) dans l'acide acétique 10 % (0,70) pour l'ériocitrine montre l'identité des deux corps.

C.5-0,58

est identifié chromatographiquement sur couche mince de polyamide dans eau-éthanol(2:3) au diglucoside-3,5 de la quercétine, déjà caractérisé dans la fraction n°6.

C.5-0,30

Nous avons récupéré 30 mg de ce composé qui est le rhamnoglucoside d'auréusidine isolé et caractérisé par CHOPIN, DELLAMONICA et LEBRETON à partir du même extrait de Citron(143). Il s'agit probablement d'un artefact provenant de la transformation subie par l'ériocitrine au cours de l'extraction alcaline des écorces séchées.

C.5-0,10

Environ 3 mg.

Jaune brillant en lumière U.V., il vire au rouge par exposition aux vapeurs d'ammoniac: c'est également une aurone.

## Spectres U.V.

|                              | $C_2H_5OH$  | $C_2H_5OH$<br>+ $CH_3 COONa$ | $C_2H_5OH$<br>+ $AlCl_3$ | $C_2H_5OH$<br>+ $C_2H_5ONa$ 0,002M |
|------------------------------|-------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| $\lambda_{max}$<br>en $m\mu$ | 255,336,408 | 274,340,430                  | 280,340,402,470          | 272,340,442                        |

D'après ces spectres l'hydroxyle en 4 est libre; ce corps semble donc appartenir à la série phloroglucique.

## Hydrolyse

L'hydrolyse acide pendant trois quarts d'heure avec l'acide chlorhydrique 2N conduit à l'auréusidine (tétrahydroxy-4, 6,3',4' aurone) et au glucose. Nous avons pu identifier l'aglycone uniquement par chromatographie avec un témoin d'auréusidine provenant de l'hydrolyse du rhamnoglucoside précédent.

Il semble que l'on ait ici à faire à l'auréusine (glucosido-6 auréusidine). Les spectres U.V. et les valeurs des Rf dans différents solvants sont d'ailleurs en accord avec ceux de la littérature (21):

| Solvants | eau  | acide acétique<br>30 % | Phénol<br>saturé d'eau | n-Butanol<br>acide acétique<br>27 %<br>(1:1) |
|----------|------|------------------------|------------------------|----------------------------------------------|
| Rf       | 0,08 | 0,16                   | 0,35                   | 0,36                                         |

C.5-0,05

Environ 5 mg.

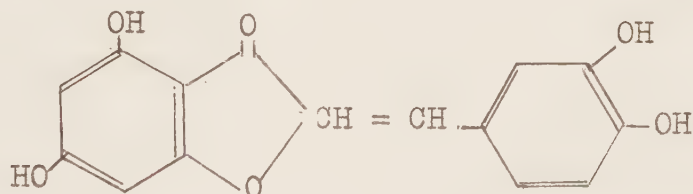
Le spectre U.V. dans l'alcool ( $\lambda_{max}$ : 254,270,334,397  $m\mu$ ) et le comportement chromatographique (de jaune vert en U.V. il vire au rouge par exposition à l'ammoniac) font ici encore penser

à une aurone.

La faible valeur du Rf dans l'acide acétique 15 % est en faveur d'un aglycone; dans différents solvants nous avons :

| Solvants | Eau  | Acide acétique<br>15 % | Phénol<br>saturé d'eau | n-Butanol-<br>acide acétique<br>27 %<br>(1:1) |
|----------|------|------------------------|------------------------|-----------------------------------------------|
| Rf       | 0,01 | 0,10                   | 0,29                   | 0,66                                          |

Le produit résiste à l'hydrolyse acide: il n'y a pas modification des Rf. D'autre part en le comparant aux aglycones obtenus par hydrolyse de C.5-0,30 et de C.5-0,10 nous avons constaté qu'il s'agissait d'auréusidine :



Nous avons donc isolé successivement le rhamnoglucoside-6 de l'auréusidine, le glucoside-6 et l'aglycone lui-même. Nous avons pu montrer que les deux derniers se forment à partir du premier, car en chromatographiant le produit de Rf 0,30 après quelques mois de conservation à l'état sec, le chromatogramme laisse apparaître les deux autres corps. Il y a donc autolyse du rhamnoglucoside.

La fraction n°4 contient exactement les mêmes substances que la fraction n°5, mais en quantités moins importantes. Ceci apparaît d'ailleurs sur les spectres U.V. des fractions totales.

pour la fraction 4 :  $\lambda_{\text{max}}^{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$  : 283,325 m  $\mu$

pour la fraction 5 :  $\lambda_{\text{max}}^{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$  : 283,325,405 m  $\mu$

Les glycosides d'aurones étant en plus grande quantité, le maximum à 405 m  $\mu$  apparaît en plus du maximum à 283 m  $\mu$  attribuable à l'ériocitrine.

Nous décrirons donc immédiatement les produits obtenus à partir de la fraction n°2

### 2.3.2.3 Etude de la fraction n°2

La chromatographie préparative dans l'acide acétique 15 % fait apparaître en plus de l'ériocitrine(0,83) et des trois aurones (Rf: 0,30;0,10 et 0,05) un produit à fluorescence noire de Rf 0,62. Le produit vire au jaune-brun par exposition aux vapeurs d'ammoniac et au jaune en lumière visible après pulvérisation d'une solution de borohydrure de potassium dans l'isopropanol. Il donne également une réaction positive au test magnésium-acide chlorhydrique.

Valeurs des Rf

| Solvants | Eau  | Acide acétique<br>60 % | B.A.W.<br>(4:1:5) | Phénol<br>saturé d'eau |
|----------|------|------------------------|-------------------|------------------------|
| Rf       | 0,30 | 0,80                   | 0,30              | 0,60                   |

Spectres U.V.

|                                      | $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ | $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$<br>+ $\text{CH}_3\text{COONa}$ | $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$<br>+ $\text{AlCl}_3$ | $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$<br>+ $\text{C}_2\text{H}_5\text{ONa}$ 0,002M |
|--------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| $\lambda_{\text{max}}$<br>en m $\mu$ | 275,350                         | 284(315)392                                                    | 282(298)355                                          | 285,420                                                                      |

Nous avons ici encore soit une flavone soit un flavonol dont l'hydroxyle en 3 est bloqué appartenant à la série phloroglucique.

L'hydroxyle en 7 est libre de même que celui en 4'. Il est possible que l'hydroxyle en 5 soit bloqué.

#### Hydrolyse acide

Nous avons utilisé la même technique que pour les corps précédents: hydrolyse une demi-heure avec l'acide chlorhydrique 2N. L'extraction à l'éther puis à l'acétate d'éthyle ne donne aucun produit alors que l'on retrouve le composé intact dans la phase aqueuse, comme le montre les spectres U.V. et la chromatographie. Il n'y a pas apparition de sucres. L'hydrolyse acide a été répétée plusieurs fois toujours avec l'acide chlorhydrique 2N : pendant une heure, trois heures et même pendant 24 heures sous atmosphère d'azote. Nous avons toujours obtenu le même résultat.

#### Hydrolyse enzymatique

Nous avons d'abord employé l'hémicellulase: 15 mg de produit sont dissous dans 10 cm<sup>3</sup> d'un tampon acétate à pH 5,6, avec 20 mg environ d'hémicellulase. Le mélange est laissé 48 heures à la température ordinaire et extrait à l'acétate d'éthyle: aucun aglycone ne passe dans la phase organique.

En utilisant la  $\beta$ -glucuronidase dans un tampon acétate pendant trois heures à 27°C, il n'y a pas non plus libération d'aglycone.

#### Fusion alcaline

La fusion alcaline est réalisée sur 10 mg avec une pastille de potasse caustique par chauffage trois minutes à 250°C. Après refroidissement, on ajoute deux gouttes d'eau et on acidifie par l'acide chlorhydrique. La solution aqueuse est extraite par l'éther. La phase étherée est à son tour extraite par une solution saturée de bicarbonate qui est ensuite acidifiée. La phase aqueuse

est réextraite par l'éther. La phase organique est alors chromatographiée sur couche mince de silice dans le système: benzène dioxane-acide acétique (90:25:4). On peut mettre en évidence l'acide protocatéchique (acide di-hydroxy-3,4 benzoïque) . La phloroglucine est caractérisée par chromatographie sur papier avec un solvant constitué par 250 cm<sup>3</sup> de chloroforme agité pendant une heure avec 50 cm<sup>3</sup> d'un mélange de 100 parties de méthanol, 96 parties d'eau et 4 parties d'acide formique. Le chromatogramme est développé avec la phase organique(144).

Ce composé dérive donc de la lutéoline, et nous avons pensé avoir une substance analogue à l'orientine ou à l'homoorientine, C-glycosides de lutéoline, isolés par HÖRHAMMER de Polygonum orientalis<sup>(1)</sup> (145). Mais le comportement chromatographique de la substance est différent.

En résumé nous avons obtenu à partir de la fraction A précipitable par l'acétate de plomb en milieu neutre, les composés suivants :

- l'ériocitrine
- la lonicérine
- la diglucosido-3,5 quercétine
- la rhamnoglucosido-6 auréusidine
- l'auréusine
- l'auréusidine
- nouveau C-glycoside de lutéoline
- l'acidecaféique et le  $\beta$ -sitostérol

parmi lesquels seuls l'ériocitrine et le  $\beta$ -sitostérol(sous forme de glucoside) avaient été précédemment isolés dans Citrus limonum

---

(1) Nous avons pu comparer à un échantillon d'orientine fourni par le Professeur HÖRHAMMER.

## 2.4 Etude de la fraction B

La chromatographie bidimensionnelle dans l'acide acétique 15 % et dans le B.A.W. (4:1:5) donne les résultats suivants:

Dans le premier solvant deux trainées apparaissent dont les Rf sont situés entre 0,21 et 0,35 d'une part et entre 0,52 et 0,70 de l'autre. Dans le second, ces taches se divisent en plusieurs produits qui sont révélés au borohydrure de potassium. La première trainée donne deux taches de Rf 0,45 et 0,50 (jaunes) et la seconde cinq taches de Rf respectifs 0,25 (jaune); 0,30 (jaune); 0,60 (magenta après exposition aux vapeurs d'acide chlorhydrique); 0,69 (jaune) et enfin 0,90 (de fluorescence bleue en U.V.)

### 2.4.1 Séparation sur colonne de cellulose

La solution alcoolique provenant de la régénération par l'hydrogène sulfuré du précipité en milieu alcalin est concentrée à sec et le résidu repris par l'eau. Cette solution aqueuse est versée sur une colonne de cellulose Solka Flock (5cm de diamètre; 32 cm de hauteur) lavée préalablement à l'alcool et à l'eau.

La colonne est développée et éluee à l'eau distillée. On recueille 30 fractions

| Fractions | Volumes des fractions |
|-----------|-----------------------|
| 1 à 4     | 100 cm <sup>3</sup>   |
| 5 à 17    | 200 cm <sup>3</sup>   |
| 18 à 30   | 250 cm <sup>3</sup>   |

### Spectres U.V.

| Fractions  | $\lambda$ C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH<br>max. |
|------------|----------------------------------------------------|
| 1 à 8      | 280-290 m $\mu$                                    |
| 9-10-11-12 | spectres peu lisibles                              |
| 13 à 30    | 270-2 335-40 m $\mu$                               |

Chromatographie sur couche mince de polyamide eau-éthanol(2:3)

| Fractions |                                 |
|-----------|---------------------------------|
| 1-2-3     | aucune tache révélabale en U.V. |
| 4 à 13    | 4 taches principales            |
| 14 à 30   | 2 taches noires                 |

#### 2.4.2 Etude des fractions 4 à 13

Les fractions 4 à 13 sont réunies et concentrées. Au cours de la concentration, il précipite un solide jaune clair qui est filtré.

Pa. ses spectres U.V. (  $\lambda_{\text{max}}^{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$  : 286 (377) m $\mu$ ) et I.R. et par comparaison directe il est identifié à l'hespéridine dont on récupère ainsi encore 500 mg. Le filtrat est chromatographié dans l'acide acétique 5 % sur papier Arches 310 . Il apparaît quatre bandes principales:

|     | Rf   | U.V. | NH <sub>3</sub> | KBH <sub>4</sub> /HCl |
|-----|------|------|-----------------|-----------------------|
| I   | 0,40 | noir | jaune brun      | jaune                 |
| II  | 0,58 | bleu | bleu            |                       |
| III | 0,70 | noir |                 | magenta               |
| IV  | 0,85 | bleu | bleu            |                       |

Chacune des bandes est découpée, éluée par l'éthanol 50 % et les solutions concentrées.

La bande de Rf 0,70 (III) correspond encore à l'hespéridine. Ce glycoside pratiquement insoluble dans l'alcool lorsqu'il est pur, paraît relativement soluble au contraire s'il est mélangé à d'autres substances.

Chacun des éluats obtenus à partir des autres bandes est chromatographié dans le B.A.W.(4:1:5) toujours sur Arches 310.

#### 2.4.2.1 Etude de la bande de Rf 0,40(I)

Dans le B.A.W. on obtient une série de produits dont les Rf sont indiqués ci-après :

| Rf   | U.V. | NH <sub>3</sub> | KBH <sub>4</sub> |
|------|------|-----------------|------------------|
| 0,23 | noir | jaune brun      | jaune            |
| 0,29 | noir | jaune brun      | jaune            |
| 0,51 | noir |                 | jaune            |
| 0,61 | noir |                 | magenta          |
| 0,90 | bleu |                 |                  |
| 0,94 | bleu |                 |                  |

Les bandes sont à nouveau découpées, éluées et chacun des produits étudié séparément.

##### a) Substance de Rf 0,23

La solution alcoolique de l'éluat est évaporée:  
poids du résidu 80 mg.

Le test au magnésium chlorhydrique donne une légère coloration rose.

Valeurs des Rf

| Solvants | Eau  | Acide acétique<br>15 % | Phénol<br>saturé d'eau | B.A.W.<br>(4:1:5) | B.E.W.<br>(4:1:2,2) |
|----------|------|------------------------|------------------------|-------------------|---------------------|
| Rf       | 0,22 | 0,63                   | 0,71                   | 0,13              | 0,42                |

B.E.W.: n-butanol-éthanol-eau

## Spectres U.V.

|                              | $C_2H_5OH$ | $C_2H_5OH$<br>+ $CH_3COONa$ | $C_2H_5OH$<br>+ $AlCl_3$ | $C_2H_5OH$<br>+ $C_2H_5ONa$ |
|------------------------------|------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| $\lambda_{max}$<br>en $m\mu$ | 275,347    | 284,380                     | 281,300,355              | 272,282,410                 |

Nous avons donc ici une flavone de la série phloroglucique. La position 7 est occupée par un hydroxyle libre de même que la position 4'. Nous avons vraisemblablement un hydroxyle en 5.

## Hydrolyse acide

Réalisée dans les conditions habituelles, l'hydrolyse acide ne libère pas d'aglycone et le produit se retrouve dans la phase aqueuse. Le même résultat est obtenu en prolongeant le temps de réaction à 24 heures sous azote.

## Hydrolyse enzymatique

De même que pour la substance obtenue en milieu neutre (C2-0,62) l'hémicellulase et la  $\beta$ -glucuronidase n'ont pas d'action.

## Fusion alcaline

La fusion alcaline sur 10 mg pendant trois minutes à 250°C conduit au phloroglucinol et à l'acide isovanillique (acide hydroxy-3 méthoxy-4 benzoïque) identifiés par chromatographie sur papier dans le B.A.W. (4:1:5), (0,76;0,92) et dans le système chloroforme-méthanol-eau-acide formique(144)(0,01;0,31).

L'aglycone est donc la diosmétine (trihydroxy-5,7,3' méthoxy-4' flavone) et comme ce composé résiste à l'hydrolyse acide ou enzymatique, il s'agit ici encore d'un dérivé C-glycosylé. Parmi tous les C-glycosides isolés jusqu'à présent aucun ne possède cet aglycone. Seul le scoparoside (70) (C-glycoside du

chrysoériol ou trihydroxy-5,7,4 méthoxy-3' flavone) présente un schéma de substitution comparable.

b) Substance de Rf 0,29

Bien qu'apparemment homogène en chromatographie sur papier :

| Solvants | Eau  | Acide acétique<br>60 % | Phénol<br>saturé d'eau | B.A.W.<br>(4:1:5) | B.E.W.<br>(4:1:2,2) |
|----------|------|------------------------|------------------------|-------------------|---------------------|
| Rf       | 0,33 | 0,73                   | 0,61                   | 0,18              | 0,45                |

et sur couche de polyamide dans eau-éthanol (2:3), nous avons en fait un mélange.

En effet l'hydrolyse acide de la substance pendant trois quarts d'heure dans l'acide chlorhydrique 2N permet de séparer:

- par extraction à l'acétate d'éthyle et à l'éther de la phase aqueuse, un aglycone, identifié à l'isorhamnétine (tétra-hydroxy-3,5,7,4' méthoxy-3' flavone) par ses spectres U.V. [ $\lambda_{\max}$  dans l'alcool 255, (306), 370 m $\mu$ ] et chromatographie en couche mince de silice dans toluène-acide acétique-acide formique (5:4:1) (0,59) et benzène-acétate d'éthyle (4:1) (0,37).

- la solution aqueuse étant concentrée, il se forme un précipité gélatineux extractible au butanol normal. Ce corps présente exactement les mêmes Rf que le produit de départ, et si l'hydrolyse est effectuée pendant une heure et demie ou même 24 heures sous azote, le précipité apparaît également.

- enfin les sucres libérés ont été identifiés par chromatographie sur papier dans le B.A.W.(4:1:5) et le phénol saturé d'eau au glucose et à l'arabinose.

## Spectres U.V.

Les études spectrales U.V. sont résumées dans le tableau suivant :

| $\lambda$ max<br>en m $\mu$     | $C_2H_5OH$ | $C_2H_5OH$<br>$CH_3COONa$ | $\Delta\lambda$<br>II | $\Delta\lambda$<br>I | $C_2H_5OH$<br>$+AlCl_3$ | $\Delta\lambda$<br>II | $\Delta\lambda$<br>I | $C_2H_5OH$<br>$+C_2H_5ONa$<br>0,002M | $\Delta\lambda$<br>II | $\Delta\lambda$<br>I |
|---------------------------------|------------|---------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Produit<br>de départ            | 274,335    | 283,375                   | 9                     | 50                   | 280,305,<br>343         | 6                     | 8                    | 285,340,408                          | 11                    | 73                   |
| Hydrolyse<br>1h30<br>Phase aq.  | 275,338    | 284,370                   | 9                     | 40                   | 283,306,<br>345         | 8                     | 7                    | 285,335,408                          | 10                    | 70                   |
| Hydrolyse<br>1h30<br>Précipité  | 275,335    | 284,375                   | 9                     | 40                   | 282,306,<br>345         | 6                     | 10                   | 285,338,408                          | 10                    | 73                   |
| Hydrolyse<br>24h.<br>Phase but. | 274,336    | 284,375                   | 10                    | 39                   | 284,305,<br>343         | 10                    | 7                    |                                      |                       |                      |

Ces dérivés sont donc des flavones ou des glycosido-3 flavonols de la série phloroglucique.

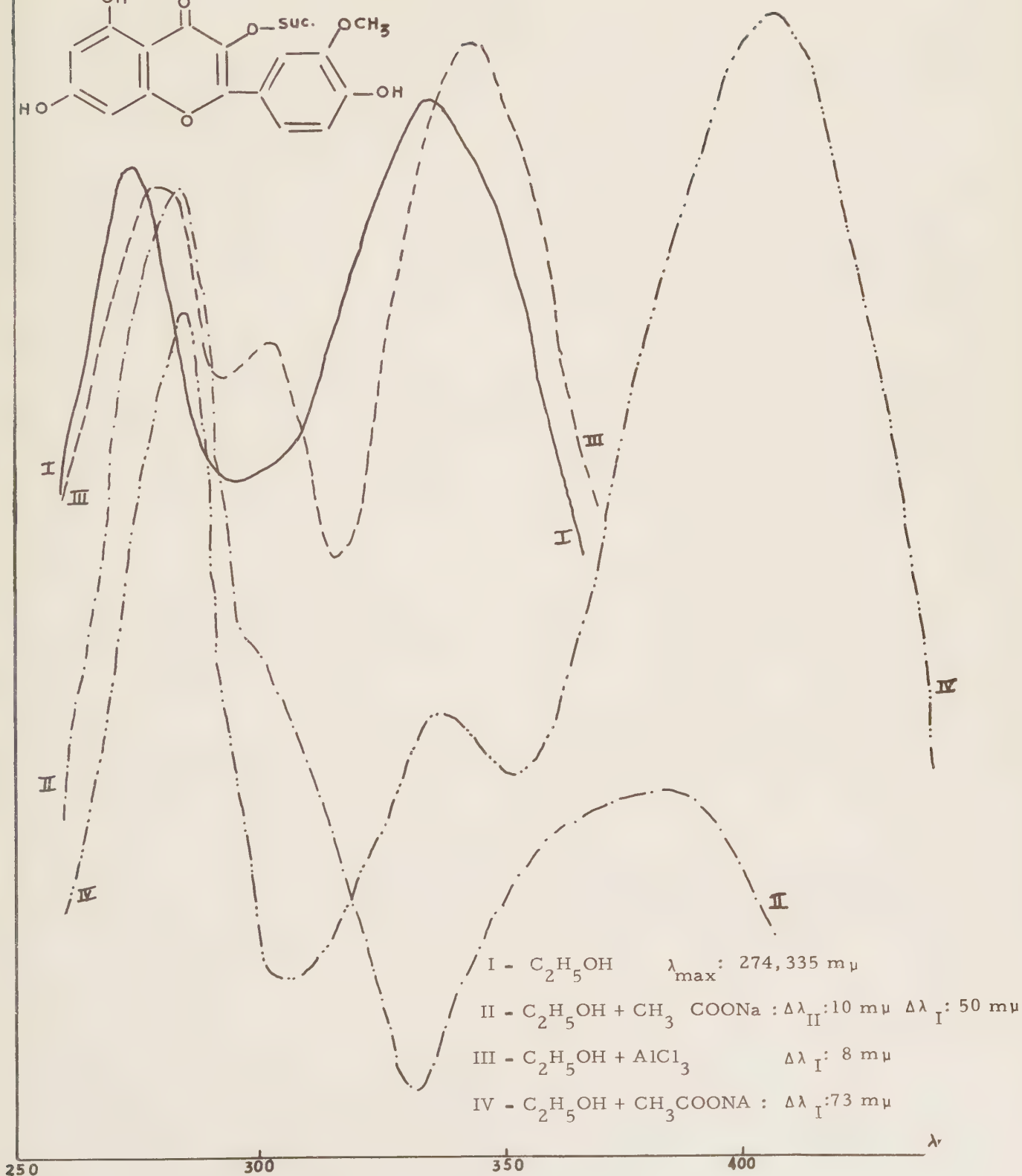
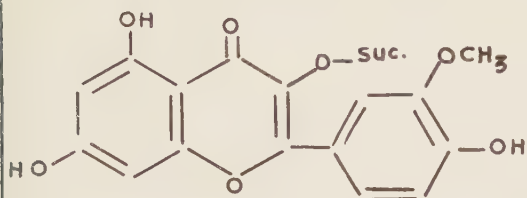
Les hydroxyles 7 et 4' sont libres dans les deux substances. Par conséquent les sucres dans le glycoside d'isorhamnétine sont certainement attachés en 3. D'autre part le Rf du produit précipitant après hydrolyse n'ayant pas changé, le glucose et l'arabinose libéré proviennent tous les deux du glycoside d'isorhamnétine.

Sur le produit non hydrolysé en milieu acide nous avons ici encore essayé les hydrolyses enzymatiques par l'hémicellulase et la  $\beta$ -glucuronidase, mais sans succès.

La fusion alcaline de ce composé conduit également au phloroglucinol et en plus à l'acide p.hydroxybenzoïque.

E

## Glycosyl-3 Isorhamnetine



250

300

350

400

 $\lambda$



Ces corps ont été identifiés par chromatographie sur papier dans le B.A.W. (4:1:5) (0,76;0,90) et dans le système chloroforme-méthanol-eau-acide formique (0,01;0,18).

Nous avons donc vraisemblablement un C-glycoside de l'apigénine (tri-hydroxy-5,7,4' flavone). On connaît déjà au moins trois C-glycosides de cette flavone: la vitexine et son isomère la saponarétine (146,147) et également le "flavonoïde B" isolé du germe de blé par KING (148) et de Triticum dicoccum par HARBORNE (149).

Les spectres U.V. du C-glycoside isolé du Citron et du flavonoïde B sont très semblables et leurs spectres I.R. voisins, mais leurs Rf sont différents et nettement plus élevés dans les solvants aqueux que ceux de la vitexine et de la saponarétine :

|                       | Eau  | B.A.W.<br>(4:1:5) |
|-----------------------|------|-------------------|
| C-glycoside du Citron | 0,33 | 0,18              |
| flavonoïde B (1)      | 0,29 | 0,19              |

Ces deux corps, très proches sans doute, semblent différer seulement par la chaîne latérale.

c) Substance de Rf 0,51

Elle correspond aux substances contenues dans les fractions 14 à 30 de la chromatographie sur cellulose que nous examinerons plus loin.

---

(1) échantillon fourni par le Docteur J.B. HARBORNE.

d) Substance de Rf 0,61

Il s'agit ici d'une faible quantité d'hespéridine qui a été entraînée.

e) Substances de Rf 0,90 et 0,94

Elles sont identiques aux produits de la bande de Rf 0,58 (II) dans la chromatographie préparative dans l'acide acétique 5 % que nous allons décrire maintenant.

2.4.2.2 Etude de la bande de Rf 0,58 (II)

La séparation sur cellulose n'ayant pas été très sélective, nous retrouvons les composants de la bande précédente. Mais les produits à fluorescence bleue de Rf élevés (0,90 et 0,94) sont plus abondants et nous avons pu les séparer.

Après chromatographie de (II) dans le B.A.W.(4:1:5) on obtient une bande de Rf 0,90. Cette bande est découpée et éluée. L'éluat est concentré à sec et le résidu repris par l'acétate d'éthyle. La solution obtenue est extraite au bicarbonate de sodium 10 %. La phase inférieure acidifiée est à nouveau extraite à l'éther.

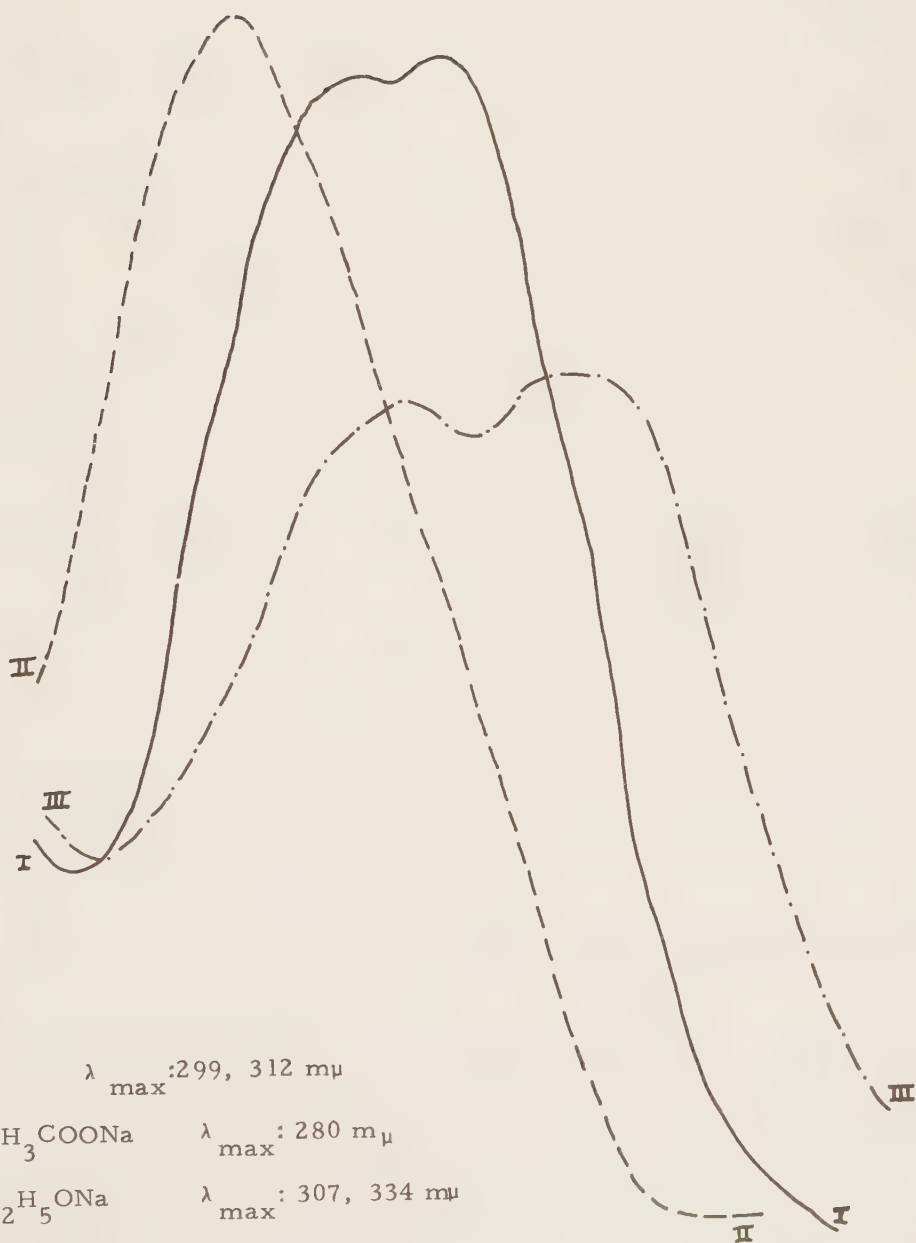
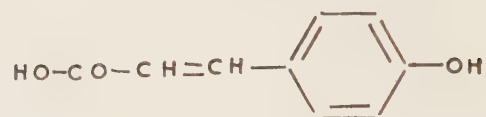
Cette fraction soluble dans le bicarbonate donne en chromatographie sur couche mince de silice trois bandes à fluorescence bleue de Rf 0,85, 0,68 et 0,62 dans benzène-dioxane-acide acétique (90:25:4) Nous effectuons une chromatographie préparative sur gel de silice H (sans liant) pour séparer les trois constituants

a) le produit de Rf 0,62 donne les spectres U.V.suivants:

|                               | $C_2H_5OH$ | $C_2H_5OH$<br>+ $CH_3COONa$ | $C_2H_5OH$<br>+ $C_2H_5ONa$ 0,002M |
|-------------------------------|------------|-----------------------------|------------------------------------|
| $\lambda_{max}$<br>en m $\mu$ | 299,312    | 280                         | 307,334                            |

E

## ACIDE p-COUMARIQUE



I -  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$   $\lambda_{\text{max}}$ : 299, 312  $\text{m}\mu$

II -  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH CH}_3\text{COONa}$   $\lambda_{\text{max}}$ : 280  $\text{m}\mu$

III -  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH C}_2\text{H}_5\text{ONa}$   $\lambda_{\text{max}}$ : 307, 334  $\text{m}\mu$

 $\lambda \text{ m}\mu$ 

200

250

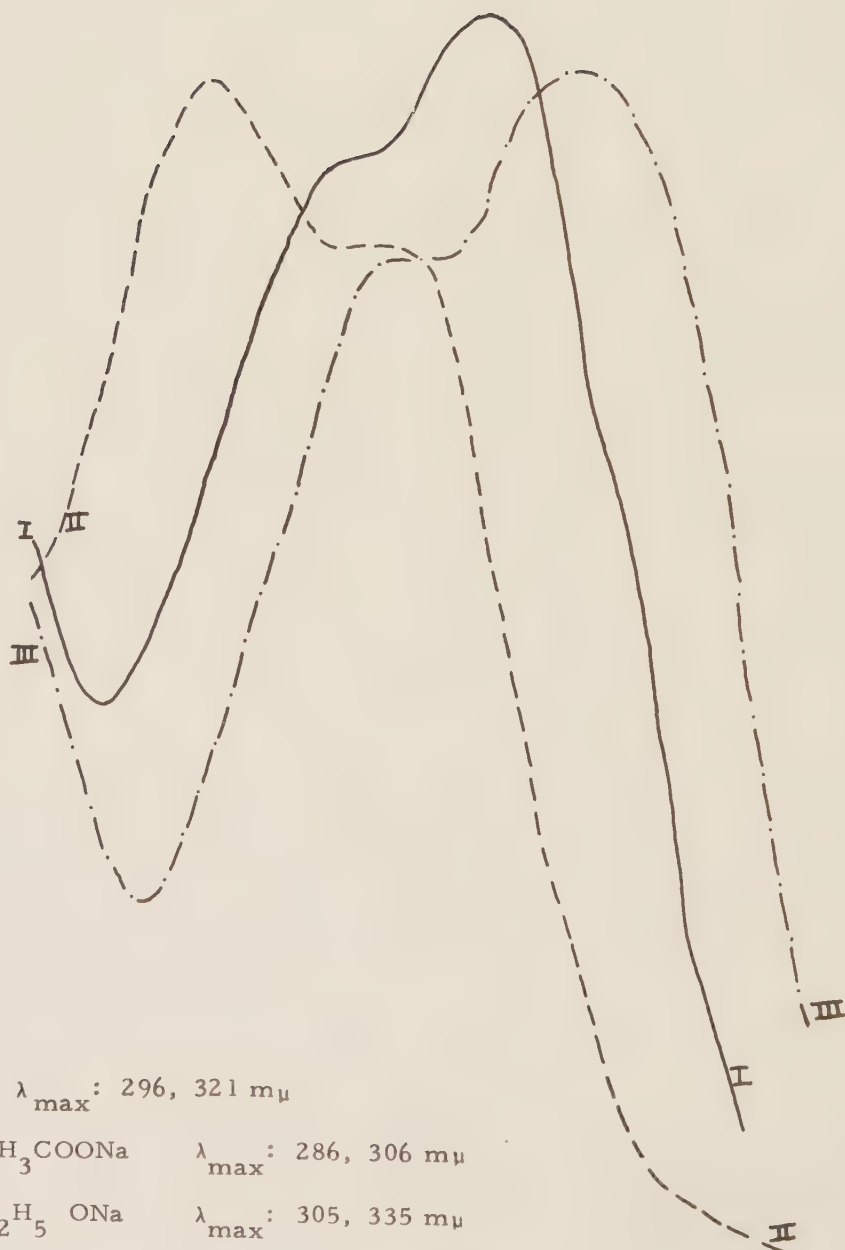
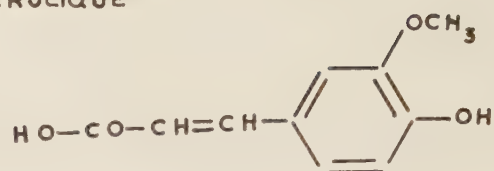
300

350

400

E

## ACIDE FERULIQUE



200

250

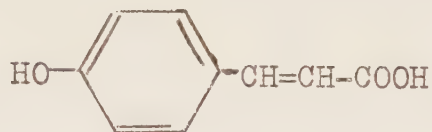
300

350

400

 $\lambda \text{ m}\mu$

Ils sont identiques à ceux de l'acide p-coumarique

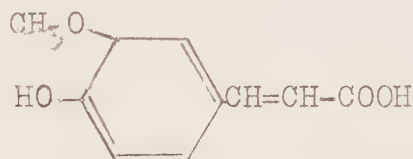


et nous avons identifié les deux corps par chromatographie sur gel de silice avec un échantillon de référence.

b) le produit de Rf 0,65 a pour spectre U.V.

|                              | $C_2H_5OH$ | $C_2H_5OH$<br>+ $CH_3COONa$ | $C_2H_5OH$<br>+ $C_2H_5ONa$ |
|------------------------------|------------|-----------------------------|-----------------------------|
| $\lambda_{max}$<br>en $m\mu$ | 296, (321) | 286, 306                    | 305, 335                    |

Il a été identifié à l'acide férulique par le même procédé



c) enfin nous n'avons pu caractériser le corps de Rf 0,85: il est en trop petite quantité. Il s'agit certainement d'une coumarine comme le montre le spectre U.V.

$\lambda_{max}^{C_2H_5OH}$  : 320  $m\mu$  et dans la soude 1% 378  $m\mu$

et son odeur très caractéristique.

De même la bande IV de Rf 0,85 dans l'acide acétique 5 % apparaît être un composé de ce type.

Plusieurs coumarines ont d'ailleurs été isolées du Citrus limonum : la scopolétine (hydroxy-7 méthoxy-6 coumarine)

et l'ombelliférone (hydroxy-7 coumarine) se retrouvent dans l'extrait étudié par HOROWITZ (34).

### 2.4.3 Etude des fractions 14 à 30

Les fractions sont réunies, concentrées et lyophilisées. On obtient une poudre jaune clair (environ 100 mg).

Le produit paraît homogène en chromatographie sur papier :

| Solvants | Eau-éthanol<br>(2:3) | Acide acétique<br>30 % | B.A.W.<br>(4:1:5) |
|----------|----------------------|------------------------|-------------------|
| Rf       | 0,86                 | 0,65                   | 0,51              |

Mais en couche mince de polyamide, il apparaît deux taches :

| Solvants | Eau-éthanol<br>méthyl éthyl-cétone-<br>acétylacétone<br>(13:3:3:1) | Eau-éthanol<br>méthyl éthyl cétone<br>(4:2:1) | Eau-<br>éthanol<br>(2:3) |
|----------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------|
| Rf       | 0,45<br>0,27                                                       | 0,48<br>0,29                                  | 0,42<br>0,55             |

### Spectres U.V. du mélange

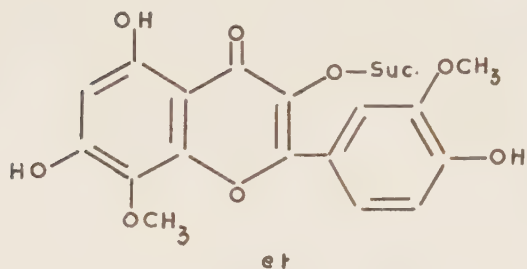
|                                | $C_2H_5OH$ | $C_2H_5OH$<br>+ $CH_3COONa$ | $C_2H_5OH$<br>+ $AlCl_3$ | $C_2H_5OH$<br>+ $C_2H_5ONa$ 0,002M |
|--------------------------------|------------|-----------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| $\lambda_{max}$<br>en m/ $\mu$ | 276,347    | 284,382                     | 283' (302)350            | 282,390                            |

Nous avons donc un mélange de flavones ou de flavonols de série phloroglucique dont les positions 5,7 et 4' sont occupées par des hydroxyles libres.

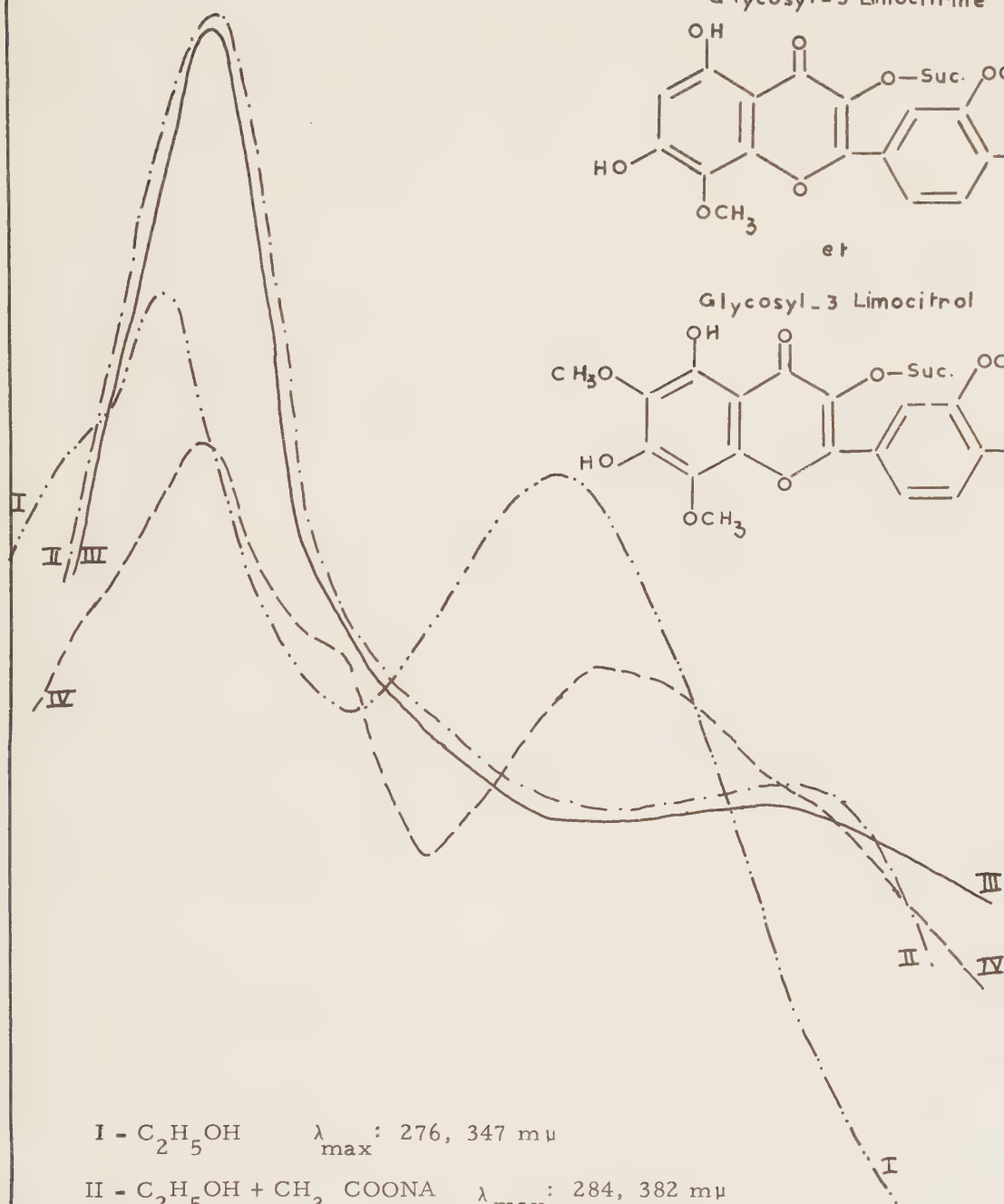
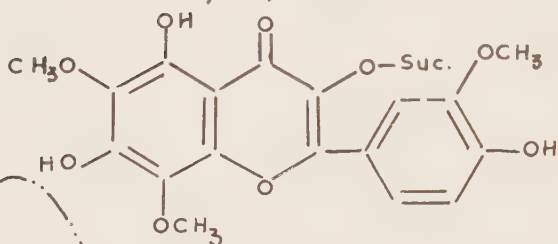
E

Mélange des

Glycosyl-3 Limocitrine



Glycosyl-3 Limocitrol



I -  $C_2H_5OH$   $\lambda_{max}$  : 276, 347 m $\mu$

II -  $C_2H_5OH + CH_3COONa$   $\lambda_{max}$  : 284, 382 m $\mu$

III -  $C_2H_5OH + C_2H_5ONa$

IV -  $C_2H_5OH + AlCl_3$   $\lambda_{max}$  : 283, (302), 350 m $\mu$

250

300

350

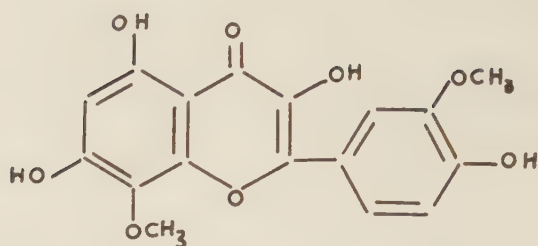
400

 $\lambda m\mu$ 

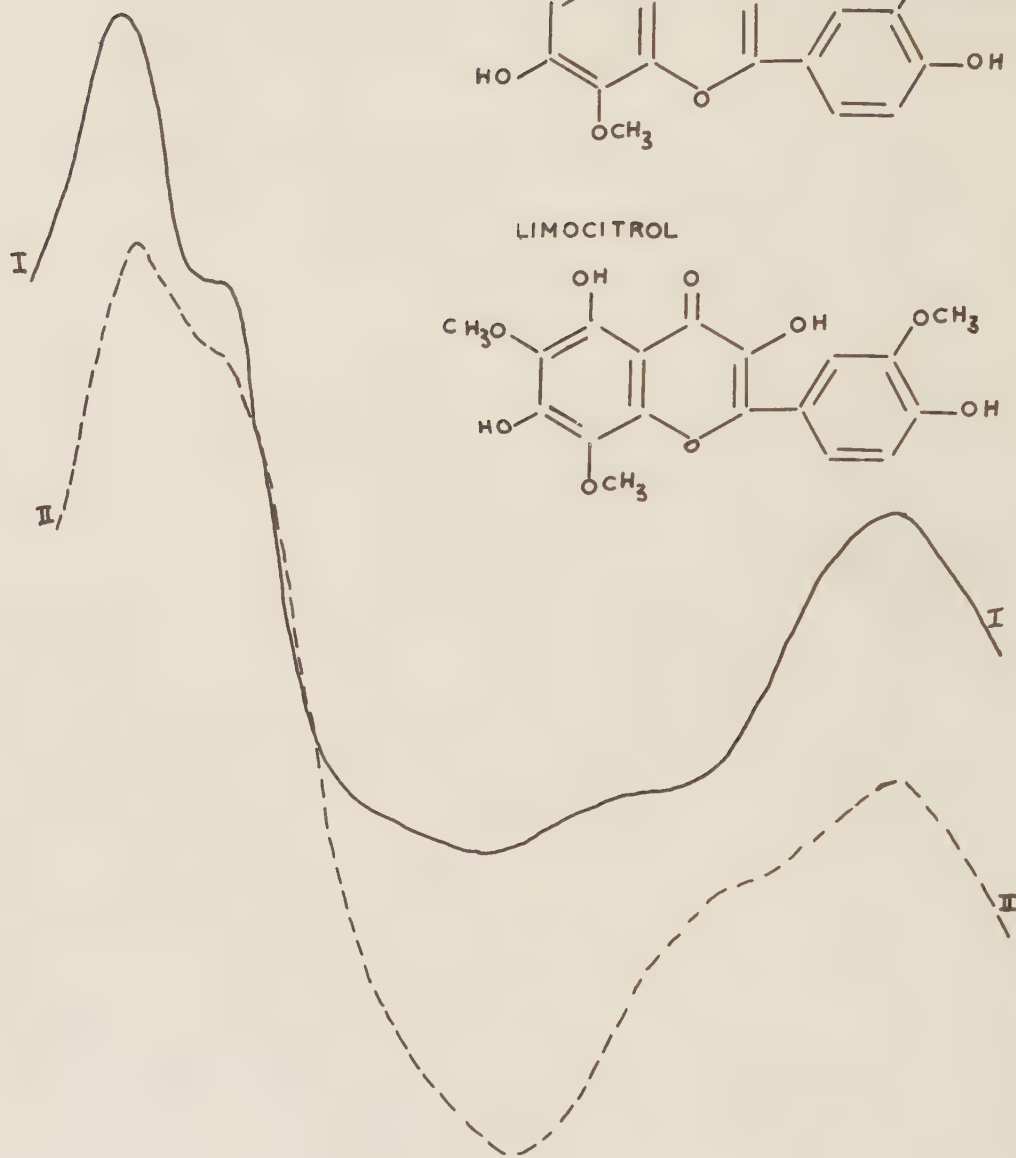
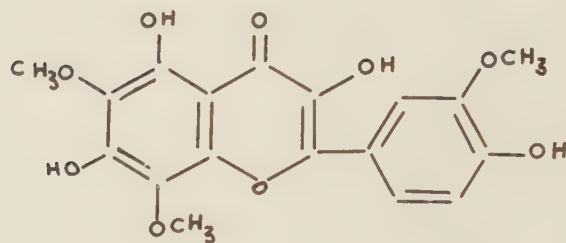
450

E

## LIMOCITRINE



## LIMOCITROL



I - Limocitrine  $\lambda_{\text{max}}^{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$  : 259 (273) (340) 378  $\text{m}\mu$

II - Limocitrol  $\lambda_{\text{max}}^{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$  : 260 (275) (350) 378  $\text{m}\mu$

200

250

300

350

 $\lambda \text{ m}\mu$   
400

La séparation du mélange étant impossible en chromatographie sur papier, nous l'avons effectuée sur couche mince de polyamide. Mais les glycosides ne peuvent alors être élués de leur support avec l'eau, l'éthanol ou même la pyridine et le diméthylformamide.

Pour effectuer l'hydrolyse acide, nous avons donc traité le produit adsorbé sur polyamide. Les chromatoplaques sont révélées en lumière U.V.; les bandes correspondant aux substances apparaissent noires et sont délimitées au moyen d'une épingle. On pulvérise un peu d'eau pour humidifier le polyamide qui est alors plus facile à détacher de la plaque.

L'ensemble flavonoïde-polyamide est placé en suspension dans l'acide chlorhydrique 2N et chauffé au bain-marie bouillant une demi-heure.

La suspension est centrifugée après refroidissement; la solution est extraite à l'acétate d'éthyle et le précipité de polyamide est lavé avec le même solvant. Les solutions organiques colorées en jaune sont réunies, concentrées à sec et le résidu repris par l'éthanol. On obtient ainsi les deux aglycones dont les spectres U.V. diffèrent très peu

|                                                | $\lambda_{\text{max}}^{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$ |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Aglycone correspondant au glycoside de Rf 0,35 | 259, (273), (340), 370 m $\mu$                         |
| Aglycone correspondant au glycoside de Rf 0,42 | 260, (275), (350), 378 m $\mu$                         |

Ces spectres sont ceux de la limocitrine et du limocitrol isolés par HOROWITZ et GENTILI(34). La comparaison chromatographique avec un échantillon témoin des deux substances(\*) permet de les identifier.

---

(\*) fournis par le Docteur HOROWITZ

En couche mince de silice avec pour solvant toluène-acide formique-acide acétique (4:1:3) le limocitrol a pour Rf 0,24 et la limocitrine 0,29. C'est le glycoside de limocitrol qui a le Rf le plus élevé sur polyamide.

Le limocitrol est la tétrahydroxy-3,5,7,4' triméthoxy-6,8,3' flavone et la limocitrine, la tétrahydroxy-3,5,7,4' diméthoxy-8,3' flavone.

Les sucres attachés en position 3 d'après les spectres U.V. ont été caractérisés par chromatographie sur papier dans le phénol saturé d'eau et le B.A.W. (4:1:5). Ce sont pour les deux glycosides : glucose et arabinose.

L'enregistrement photométrique après révélation au phtalate d'aniline permet de déterminer la proportion relative des sucres. L'arabinose se révélant en rouge et le glucose en brun, pour obtenir des résultats comparables, nous avons déposé deux solutions témoins contenant l'une une molécule de glucose et une molécule d'arabinose et l'autre deux molécules de glucose pour une molécule d'arabinose. Nous avons ensuite mesuré la hauteur des pics ainsi que le poids de leur surface après découpage:

| Sucres                      | Rapport $\frac{G}{A}$<br>Hauteurs des pics | Rapport $\frac{G}{A}$<br>Poids |
|-----------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------|
| 2 glucose +<br>1 arabinose  | 1,13                                       | 1,12                           |
| 1 glucose +<br>1 arabinose  | 0,81                                       | 0,75                           |
| Glycoside de<br>limocitrol  | 1,2                                        | 1,1                            |
| Glycoside de<br>limocitrine | 0,45                                       | 0,60                           |

Il apparait donc que le glycoside de limocitrol contient en position 3 deux molécules de glucose pour une molécule d'arabinose et celui de limocitrine une molécule de chacun des sucres (bien que les résultats soient moins concordants).

Ceci est d'ailleurs en accord avec les Rf de la chromatographie plaque d'après les travaux de EGGER (47).

En résumé, nous avons obtenu à partir de la fraction précipitable par l'acétate de plomb en milieu alcalin les composés suivants:

l'hespéridine

un arabinoglucoside-3 de l'isorhamnétine

un arabinodiglucoside-3 du limocitrol

un arabinoglucoside-3 de la limocitrine

un C-glycoside de la diosmétine

un nouveau C-glycoside de l'apigénine

l'acide p.coumarique et l'acide férulique

parmi lesquels seuls l'hespéridine et les acides p-coumarique et férulique étaient connus dans le Citrus limonum; de même que les aglycones des autres glycosides.

Nous résumerons l'étude des fractions A et B dans les tableaux suivants :

## Fraction A

2.3.1 Distribution à contre-courant

7 fractions dont 4 principales

2.3.1 Chromatographie préparative  
(acide acétique 15 %)

2.3.2.1

Fraction 6

(  $\beta$ -sitostérol  
{ acide cafféique (0,80)  
diglucosido-3,5 quercétine(0,60)  
lonicérine (0,40  
rhamnoglucosido-6-auréusidine  
(0,30)  
auréusine (0,10)  
auréusidine (0,05)

2.3.2.2

Fractions 5 et 4

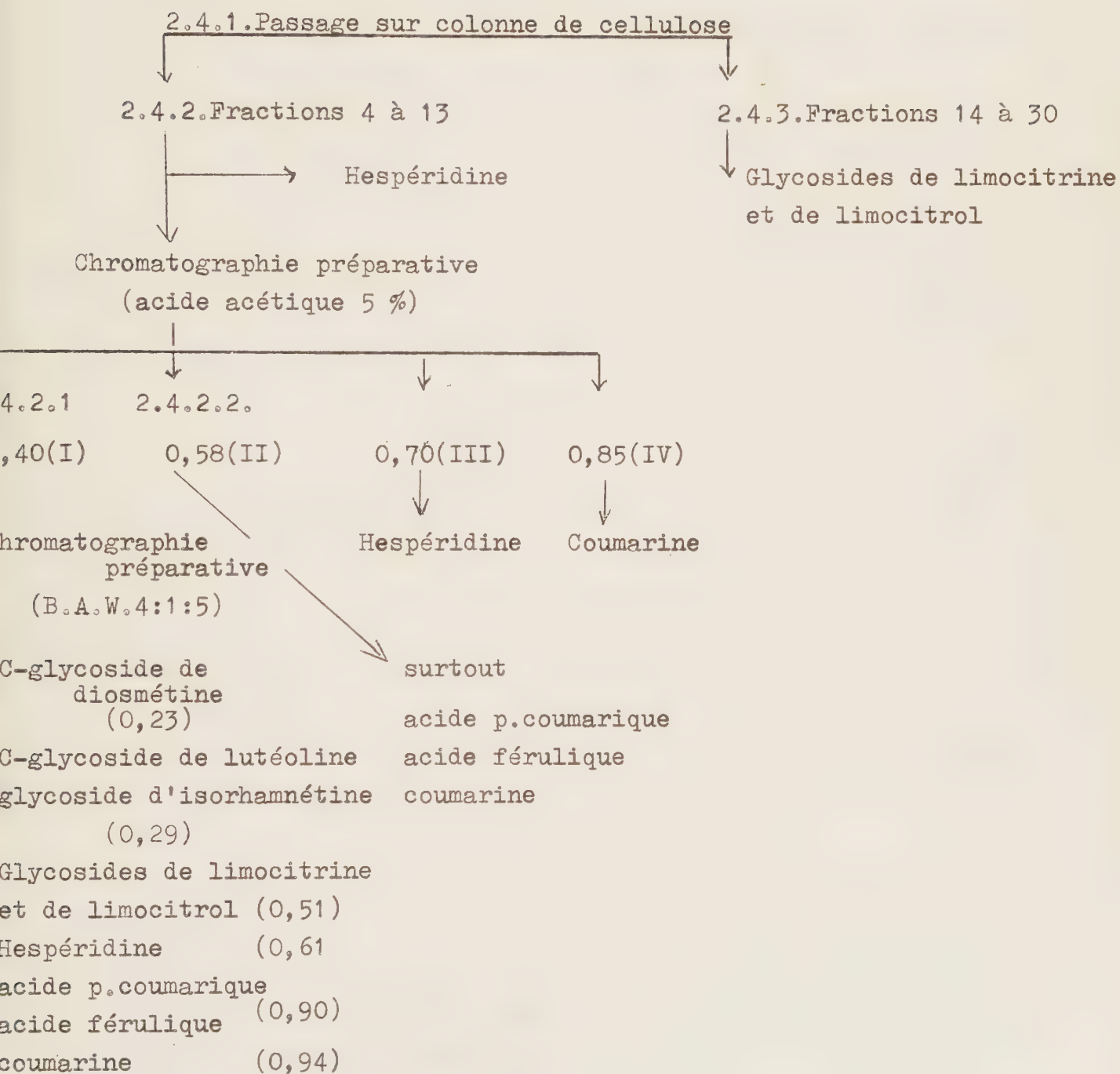
ériocitrine(0,82)  
diglucosido-3,5  
quercétine (0,58)  
rhamnoglucosido-6  
auréusidine(0,30)  
auréusine (0,10)  
auréusidine(0,05)

2.3.2.3

Fraction 2

ériocitrine(0,83)  
C-glycoside-de  
lutéoline (0,62)  
rhamnoglucoside-6  
auréusidine(0,30)  
auréusine (0,10)  
auréusidine(0,05)

## Fraction B



## 2.5. Conclusions

Lorsque nous avons commencé ce travail, les seuls glycosides identifiés sans ambiguïté dans l'écorce de citron étaient l'hespéridine, la diosmine et l'ériocitrine tous des rutinosides-7.

Nous avons effectivement retrouvé l'hespéridine et l'ériocitrine comme constituants les plus importants, mais nous avons pu en outre caractériser dix nouveaux glycosides dont sept sont des O-glycosides dont les aglycones (sauf l'auréusidine) avaient été identifiés dans l'écorce de citron et trois sont des C-glycosides nouveaux. Quatre sont des glycosides de flavones :

- un rhamnoglucoside-7 de la lutéoline, ou lonicérine;
- un C-glycoside de l'apigénine;
- un C-glycoside de la lutéoline;
- un C-glycoside de la diosmétine,

dont seul le premier était connu à l'état naturel.

Quatre sont des glycosides de flavonols :

- le diglucoside-3,5 de la quercétine;
- un arabinoglucoside-3 de l'isorhamnétine;
- un arabinoglucoside-3 de la limocitrine;
- un arabinc diglucoside-3 du limocitrol,

dont aucun n'était connu à l'état naturel.

Deux sont des glycosides d'aurones :

- un rhamnoglucoside-6 d'auréusidine;
- le glucoside-6 de l'auréusidine, ou auréusine,

dont seul le second était connu à l'état naturel.

Toutefois, des résultats encore non publiés obtenus dans ce laboratoire par Mlle DELLAMONICA permettent de penser que les deux glycosides d'aurones sont des artefacts résultant, le premier de l'oxydation de l'ériocitrine dans le milieu alcalin d'extraction

des écorces, le second d'une autolyse du premier comme nous l'avons nous même observé.

En dehors de ces flavonoïdes, nous avons identifié:

- un stérol, le  $\beta$ -sitostérol;
- trois acides hydroxycinnamiques: l'acide p.coumarique, l'acide cafféique et l'acide férulique dont seul le premier avait été isolé du Citron.

En ce qui concerne le schéma glycosidique des flavonoïdes, c'est la première fois que se trouve mis en évidence la présence d'arabinoglucosides dans le genre Citrus; les seuls glycosides jusqu'alors décrits étaient des glucosides ou des rhamnoglucosides.

D'autre part, ce n'est que dans une publication toute récente de HOROWITZ (150) que se trouve mentionné sans aucun détail l'existence dans le genre Citrus de la vitexine et de C-glycosides apparentés.

Si l'on considère maintenant le schéma de substitution du squelette flavonique, tous les composés que nous avons isolés possèdent un noyau A dérivé de la phloroglucine avec des groupements hydroxyles en 5 et 7; limocitrine et limocitrol possédant en outre des groupements méthoxyles en 8, ou en 6 et 8.

Les substitutions sur le noyau B sont de quatre types: hydroxy-4'; dihydroxy-3'4'; hydroxy-3' méthoxy-4'; méthoxy-3' hydroxy-4'.

Ces schémas de substitution avaient tous été observés par HOROWITZ et GENTILI (34) sur les aglycones de l'écorce de Citron. Ces auteurs avaient en outre isolé l'acide sinapique (hydroxy-4 diméthoxy-3,5 cinnamique) et le chrysoériol(trihydroxy-4',5,7 méthoxy-3' flavone) que nous n'avons pas trouvés, ni à l'état libre, ni sous forme de glycosides dans les fractions que nous avons étudiées.

### CHAPITRE III

#### BENZYLATION ANORMALE DE LA PHLORACETOPHENONE

L'ériodictyol ayant été isolé de nombreuses fois soit libre, soit sous forme de glycoside de l'écorce de Citron, il nous a paru intéressant d'en entreprendre la synthèse. Celle-ci avait été effectuée avec un procédé donnant de faibles rendements et nous avons voulu essayer une autre voie passant par l'intermédiaire des o.hydroxy chalcones. Partant de matières premières fortement hydroxylées, il est nécessaire de protéger ces groupements pendant la suite des réactions. La benzylation est un mode de protection transitoire des hydroxyles phénoliques très couramment utilisé dans la synthèse des flavonoïdes polyhydroxylés du fait de sa stabilité en milieu alcalin et de l'élimination en général facile du groupement protecteur par traitement acide à chaud ou par hydrogénéolyse catalytique. C'est au cours de la benzylation de la phloracétophénone que nous avons observé un comportement anormal de ce corps si la réaction est effectuée en présence d'iodure de sodium.

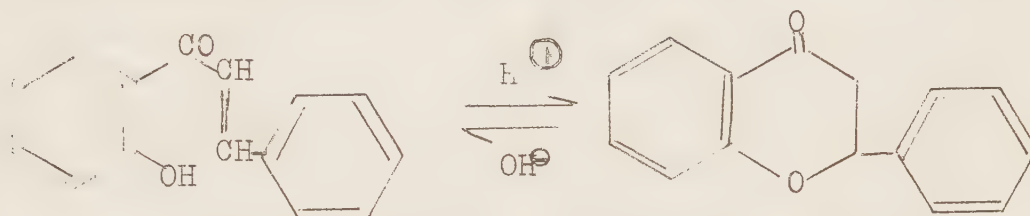
#### 3.1 Essai de synthèse de l'ériodictyol

L'une des voies d'accès des flavanones mises au point par SHINODA et SATO (151) consiste à condenser dans le nitrobenzène en présence de chlorure d'aluminium les polyphénols et les chlorures d'acide cinnamique ou dihydrocinnamique.

L'ériodictyol a été synthétisé par ces auteurs (152) en partant de la phloroglucine et du chlorure de l'acide caffeique

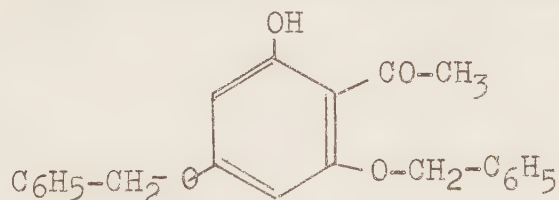
dicarbéthoxylé. Les rendements de cette réaction sont assez faibles, aussi avons nous entrepris la synthèse selon une autre voie.

Celle-ci consiste à passer par l'intermédiaire des ortho-hydroxy-chalcones qui par traitement en milieu acide peuvent se cycliser en flavanone.



Ces ortho-hydroxy chalcones s'obtiennent elles-mêmes facilement par condensation en milieu alcalin des ortho-hydroxy-acétophénonnes et des aldéhydes benzoïques substitués:

Pour la synthèse de l'ériodictyol partant de la dibenzoyloxy-2,4 phloracétophénone et de l'aldéhyde protocatéchique dibenzylé, nous avons obtenu la chalcone tétrabenzylée:



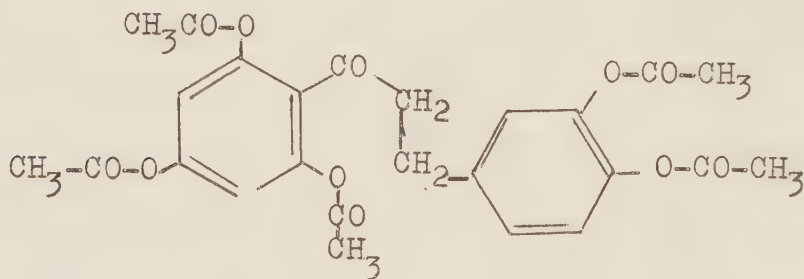
que nous avons ensuite essayée de cycliser par divers procédés.

L'hydrogénolyse en présence de charbon palladié d'une suspension de la chalcone dans l'éthanol conduit à une solution qui, après élimination du catalyseur et addition d'une solution hydroalcoolique d'acétate neutre de plomb, donne un précipité rouge. Ce précipité régénéré par action de l'hydrogène sulfuré, fournit une solution contenant deux substances de Rf 0,55 et 0,47 en chromatographie sur couche mince de gel de silice G dans benzène-acétate d'éthyle (1:1).

Nous avons séparé ces deux substances selon le procédé

à contre-courant de CRAIG dans le système acétate d'éthyle-hexane normal-eau-éthanol (6:4:5,5:4;5). Ceci aboutit à une purification de la substance de Rf 0,47, la seconde étant à l'état de traces que nous n'avons pu caractérisée.

La première donne une réaction négative au test magnésium chlorhydrique et un spectre U.V. ayant un seul maximum à 290 m $\mu$  dans l'alcool. Par conséquent il semble il y avoir eu hydrogénation de la double liaison (disparition de la conjugaison d'après le spectre U.V.) mais sans cyclisation (absence de réaction au test de SHINODA). Cette substance est très instable et se décompose rapidement en solution. Nous avons donc effectué une acétylation par l'anhydride acétique en présence de pyridine pour obtenir un dérivé cristallisé. Le dérivé acétylé obtenu correspond à un penta-acétate (F:111-2°C).



Il y a donc bien eu à la fois hydrogénation et débenzylation totale.

Les procédés de débenzylation cyclisante en milieu acide fort (chauffage pendant un temps court de la solution de la chalcone dans l'anhydride acétique en présence d'acide chlorhydrique ou bromhydrique) aboutissant à des produits rouges d'où il a été impossible de séparer un corps pur et les essais de cyclisation par chauffage prolongé en milieu acide dilué ou en présence d'acétate de sodium ne donnant pas de produits cyclisés, nous

avons utilisé le procédé de débenzylation par le chlorure d'aluminium. Mais ici encore nous n'avons obtenu qu'un mélange de deux flavanones (révélabiles en magenta par le borohydrure de potassium et l'acide chlorhydrique) que nous avons caractérisées par chromatographie sur couche mince de gel de silice G. Une de ces deux substances possède d'ailleurs les mêmes Rf que l'ériodictyol témoin; mais nous n'avons pu séparer les corps et obtenir un produit pur même après acétylation.

Nous avons également essayé de préparer l'ériodictyol par déméthylation de l'hespérétine (trihydroxy-5,7,3' méthoxy-4' flavanone) au chlorhydrate de pyridine. Le produit obtenu finalement est assez coloré et contient de nombreuses impuretés. Nous ne l'avons caractérisé que par chromatographie avec un témoin. L'hespérétine utilisée provenait de l'hydrolyse de l'hespéridine naturelle par l'acide acétique et l'acide perchlorique. Par rapport à d'autres techniques d'hydrolyse (153) ce procédé présente l'avantage d'être beaucoup plus rapide et de donner d'aussi bons rendements.

En conclusion malgré les bons rendements obtenus dans la préparation de la chalcone tétrabenzylée il n'a pas été possible de réaliser le passage à l'ériodictyol dans de bonnes conditions

### 3.2. Benzylation anormale de la phloracétophénone

La benzylation des acétophénones s'effectue généralement par action du chlorure, ou plus rarement du bromure de benzyloxy, en milieu acétonique au reflux en présence de carbonate de potassium anhydre. On peut remplacer l'acétone par le diméthylformamide (D.M.F.) ce qui diminue le temps de chauffage et augmente les rendements (154).

MURTI et SESHADRI (155) étudiant la benzylation de la

phloracétophénone (trihydroxy-2,4,6 acétophénone) dans ces conditions obtiennent avec une molécule de chlorure de benzyle la monobenzyl-4 phloracétophénone et avec un excès de réactif la dibenzyl-2,4 phloracétophénone.

De même VENKATARAMAN (156) décrit l'obtention à partir de la résacétophénone (dihydroxy-2,4 acétophénone) de la monobenzyl-4 alors que le dérivé dibenzylé aurait été obtenu par MULLAJI et SHAH (157).

Lorsque cette réaction est effectuée directement sur les flavonoïdes une technique courante consiste à ajouter au milieu réactionnel un peu d'iodure de sodium; les rendements augmentent alors de façon assez sensible. Désirant préparer la dibenzyl-2,4 phloracétophénone en vue de la synthèse de l'ériodictyol, nous avons donc utilisé ce procédé.

Or, aussi bien avec une molécule qu'avec un excès de chlorure de benzyle, nous n'avons obtenu qu'un seul dérivé substitué fondant à 123-4°C dont l'analyse correspond à un dérivé tribenzylé. Ce corps réagit très lentement au chlorure ferrique alcoolique (surtout lorsqu'on l'utilise comme révélateur sur les chromatoplaques) et d'autre part le spectre d'absorption U.V. semble indiquer une substitution autre que sur les trois groupes phénoliques. En effet il présente deux maxima :

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}} : 230 \text{ m}\mu (\log \epsilon : 4,14); 290 \text{ m}\mu (\log \epsilon : 4,33) \\ \text{inf. } 330 \text{ m}\mu (\log \epsilon : 3,54)$$

Signalons entre parenthèse que dans la soude 1 % le maximum se déplace à 295 m $\mu$  ce qui indique un hydroxyle libre.

D'après BRAUDE et SONDHEIMER (158) qui ont étudié les benzaldéhydes et les acétophénones substitués, les spectres U.V. de ces composés présentent trois bandes d'absorption :

la bande K vers 240 m $\mu$   
 la bande B vers 280 m $\mu$   
 et la bande R vers 330 m $\mu$

L'introduction d'un groupement en ortho du groupe aldéhyde ou acétyle provoque une diminution très sensible du coefficient d'extinction moléculaire alors que les autres positions ont relativement peu d'effet.

La bande K est due à une transition que l'on peut représenter par :



La réduction de l'intensité de cette bande ou même un déplacement hypsochrome sont dus à un empêchement stérique de la coplanéité nécessaire à une telle transition. La littérature indique par exemple pour différents composés (159;160,161):

| Produits                             | $\lambda_{\text{max}}$ | $\log \epsilon$ |
|--------------------------------------|------------------------|-----------------|
| acétophénone                         | 243                    | 4,12            |
| méthyl-4 acétophénone                | 252                    | 4,18            |
| méthyl-2 acétophénone                | 242                    | 3,94            |
| triméthyl-2,4,6 acétophénone         | 242                    | 3,56            |
| dihydroxy-2,6 acétophénone           | 263                    | 3,92            |
| hydroxy-2 méthoxy-6 acétophénone     | 270                    | 4,05            |
| diméthoxy-2,6 acétophénone           | 240                    | 3,34            |
| hydroxy-2 diméthoxy-4,6 acétophénone | 288                    | 4,24            |
| triméthoxy-2,4,6 acétophénone        | 274                    | 3,76            |

Par conséquent le produit tribenzylé synthétisé présentant un maximum à 290 m $\mu$  avec  $\log \epsilon$  :4,33 n'est certainement

pas benzylé sur les deux groupes en ortho du carbonyle.

D'autre part les spectres I.R. dans KBr donnent pour la fréquence de la bande carbonyle  $1618\text{ cm}^{-1}$  comme pour la dibenzyl-2,4 phloracétophénone alors que nous avons  $1680\text{ cm}^{-1}$  pour la triméthyl-2,4,6 phloracétophénone. Ceci indique une chélation entre le carbonyle et un groupe hydroxyle en ortho.

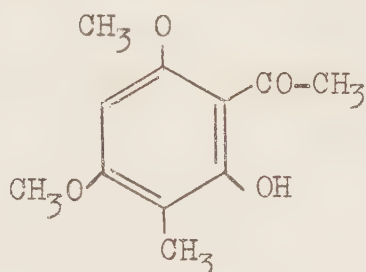
Par méthylation au sulfate de méthyle, nous n'avons pu obtenir de produit cristallisable, mais l'acétylation par l'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium anhydre donne un monoacétate (F:  $128-9^{\circ}\text{C}$ ) dont le spectre U.V. dans l'alcool  $[265\text{ m}\mu(\log \epsilon : 3,94)\text{ et }302\text{ m}\mu(\log \epsilon : 3,54)]$  et le spectre I.R. (KBr) ( $\nu_{\text{C=O}}:1675\text{ cm}^{-1}$   $\nu_{\text{OAc}}:1740\text{ cm}^{-1}$ ) permettent de penser que, d'après les travaux précédents, le groupement acétate est fixé sur l'hydroxyle libre en ortho du carbonyle. La saponification de cet acétate régénère la tribenzyl phloracétophénone initiale dont l'un des trois groupements benzyles doit être fixé sur un atome de carbone.

En effet l'hydrogènyse en présence de charbon palladié à 5 % d'une suspension du dérivé tribenzylé dans l'alcool conduit après filtration et concentration de la solution à des cristaux fondant à  $207-8^{\circ}\text{C}$  dont l'analyse correspond à un dérivé monobenzylé. L'acétylation de ce composé conduit à un triacétate (F:  $123-4^{\circ}\text{C}$ ) dont les spectres U.V.  $[233\text{ m}\mu(\log \epsilon : 3,15); \text{inf. } 243\text{ m}\mu(\log \epsilon : 3,90)]$  et I.R. dans KBr ( $\nu_{\text{C=O}}:1690\text{ cm}^{-1}$  et  $\nu_{\text{OAc}}:1760\text{ et }1740\text{ cm}^{-1}$ ) sont en faveur d'une disubstitution en ortho du carbonyle.

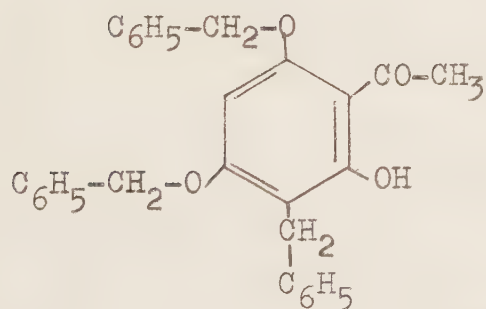
Enfin le point de fusion du dérivé monobenzylé correspond à celui de la benzyl-3 phloracétophénone ( $208^{\circ}\text{C}$ ) obtenue par RIEDL (162) dans la benzylation de la phloracétophénone en présence de sodium. Nous pouvons en conclure que le produit que nous avons obtenu par benzylation en présence d'iodure de sodium est

une C-benzyl di-O-benzyl-2,4 phloracétophénone.

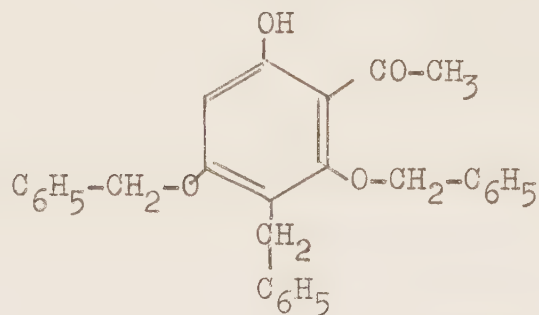
Si l'alcoylation nucléaire est la règle générale quand on opère en présence d'alcoolates alcalins (162,163), elle est exceptionnelle en milieu acétonique en présence de carbonate de potassium. Seules les méthylations par l'iodure de méthyle conduisent à des dérivés C-méthylés; et par exemple à partir de la phloracétophénone, l'hydroxy-2 méthyl-3 diméthoxy-4,6 acétophénone a été préparée par CURD et ROBERTSON (164).



Pour préciser la position du groupe C-benzyle dans le produit que nous avons obtenu et qui peut être soit (I) soit (II):



(I)



(II)

le spectre de R.M.N. n'a pu donner aucune indication. Nous avons cependant opté pour la structure (I) par analogie avec la méthylation à l'iodure de méthyle d'une part et, parce que, d'autre part, si l'on rebenzyle en présence d'iodure de sodium le dérivé monobenzylé obtenu par hydrogènyse on retombe sur le produit

initial. Si l'on suppose un empêchement stérique dû au groupe C-benzyl, on peut s'attendre en effet à une benzylation préférentielle en 4 et 6 donnant (I).

Ayant ainsi établi la C-benylation de la phloracétophénone en présence d'iodure de sodium, il était intéressant d'examiner le comportement dans les mêmes conditions de la di-O benzyl-2,4 phloracétophénone. En utilisant comme solvant aussi bien l'acétone anhydre que le D.M.F., nous avons obtenu un produit incristallisable, ne réagissant pas au chlorure ferrique et qui diffère des dérivés benzylés préparés précédemment. La chromatographie plaque sur gel de silice G donne les Rf suivants :

| Produits              | Solvants                      |                                | Réaction avec le chlorure ferrique |
|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
|                       | benzène-acétate d'éthyle(4:1) | benzène-éther de pétrole (4:1) |                                    |
| dibenzyl-2,4          | 0,90                          | 0,72                           | +                                  |
| benzyl-3 dibenzyl-2,4 | 0,97                          | 0,72                           | +                                  |
| produit obtenu        | 0,99                          | 0,57                           | -                                  |

D'autre part le spectre U.V. dans l'alcool présente un maximum à 268 m $\mu$  (log  $\epsilon$  :3,62) indiquant une disubstitution en ortho du carbonyle; et le spectre I.R. pris directement sur la substance montre une fréquence de la bande C=O de 1675 cm<sup>-1</sup>, par conséquent le carbonyle n'est pas chélaté.

Comme nous n'avons pas pu préparer de dérivés cristallisés de la fonction cétone, pour obtenir un produit solide nous avons formé la tribenzyl-2',4',6' chalcone par condensation avec l'aldéhyde benzofique. Nous avons des cristaux fondant à 131-2°C, présentant un seul maximum en U.V. à 298 m $\mu$  et dont l'analyse correspond à celle du corps attendu. Le spectre I.R.

dans KBr montre bien une bande carbonyle non chélatée à  $1640\text{cm}^{-1}$ .

Enfin l'hydrogènyse en présence de charbon palladié du produit gommeux tribenzylé en suspension dans l'alcool conduit uniquement à la phloracétophénone caractérisée par fusion mélangée avec un échantillon authentique. Il n'y a donc pas eu benzylation nucléaire de la di-O-benzyl-2,4 phloracétophénone.

En appliquant notre technique à la résacétophénone avec un grand excès de chlorure de benzyle, nous n'avons pu obtenir de substitution nucléaire mais la di-O benzyl-2,4 résacétophénone (F:84°C). La même opération réalisée avec la quantité théorique de chlorure de benzyle pour une dibenzylation conduit à un mélange de dérivé monobenzylé (F:111°C) et de dérivé dibenzylé. Le dérivé monobenzylé s'obtient facilement en chauffant la résacétophénone en solution acétonique avec un excès de réactif, mais sans iodure de sodium.

Le dérivé dibenzylé soumis à une hydrogènyse catalytique dans le D.M.F. fournit la monobenzyl-4 résacétophénone par suite d'une débenzylation partielle.

### 3.3 Conclusions

On peut résumer comme suit les résultats que nous venons d'exposer:

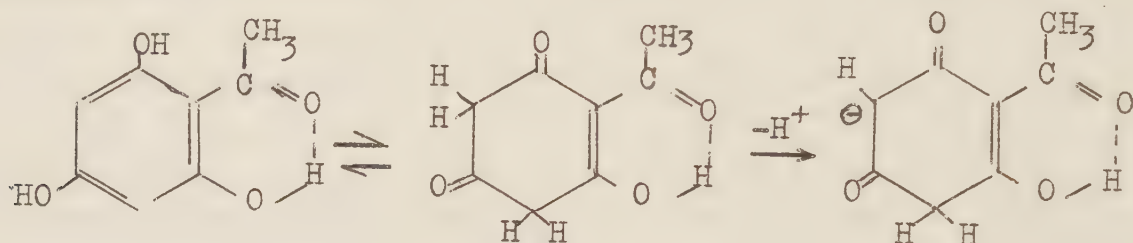
1) dans le cas de la trihydroxy-2,4,6 acétophénone, la présence d'iodure de sodium entraîne une mono-C benzylation nucléaire et la di-O benzylation, un groupement hydroxyle ortho restant libre.

2) dans le cas de la dihydroxy-2,4 acétophénone l'iodure de sodium n'entraîne pas de C-benzylation nucléaire, mais permet la benzylation des deux groupements hydroxyles.

3) dans le cas de l'hydroxy-2 dibenzyloxy-4,6 acétophéno-

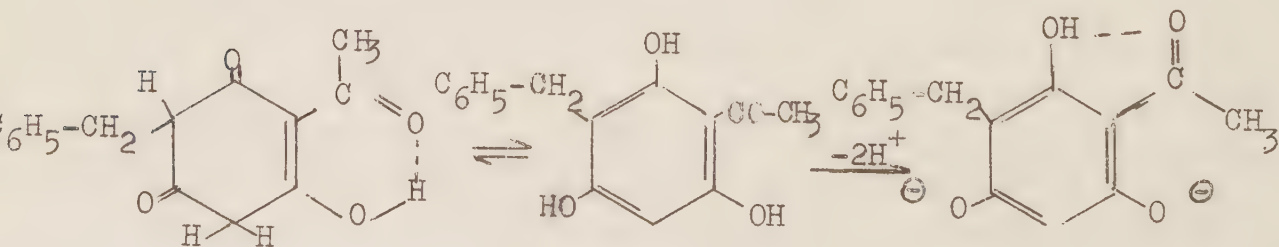
ne l'iodure de sodium permet la benzylation du groupement hydroxyle ortho.

On peut en conclure que la C-benzylation précède la benzylation des hydroxyles de la phloracétophénone, et que celle-ci doit donc réagir sous forme de carbanion dérivé de la dicétone tautomère :



Il est vraisemblable que dans l'acétone anhydre en présence de carbonate de potassium, la formation d'un seul carbanion est possible puisqu'on obtient toujours une seule C-alcoylation alors qu'en milieu aqueux en présence de bases fortes (soude ou potasse), ou en milieu alcoolique en présence d'alcooates de sodium, les quatre hydrogènes en 3 et 5 peuvent être alcoylés (162).

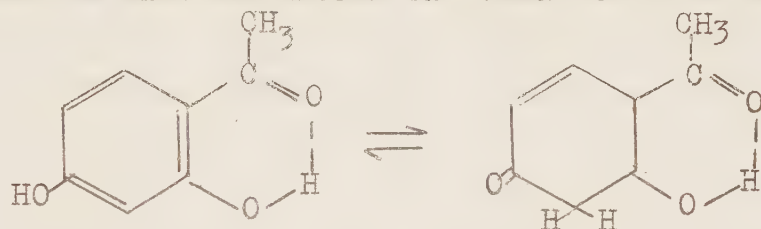
Après substitution nucléophile de l'halogénure de benzyle, la C-benzyl phloracétophénone ne peut plus s'ioniser qu'au niveau des groupements hydroxyles de la forme tautomère phénolique et la benzylation ultérieure s'effectue sur les anions phénates



en accord avec le fait que nous avons obtenu le même produit par benzylation de la phloracétophénone ou de la C-benzylphloracétophénone.

L'impossibilité de benzylation du dernier hydroxyle être attribué à l'empêchement stérique du groupement benzyle voisin puisque cette benzylation est possible sur la di-O-benzyl-2,4 phloracétophénone.

Avec la résacétophénone, la C-alcoylation observée en présence de bases fortes, n'est plus possible en milieu acétonique en présence de carbonate de potassium, probablement parce que la mobilité de l'hydrogène en 3 de la forme cétonique est insuffisante pour permettre dans ce milieu la formation d'un carbanion.



Mais l'intérêt majeur de nos observations sur l'influence de l'iodure de sodium sur la benzylation est la démonstration de la possibilité de benzyler le groupement hydroxyle en ortho du carbonyle, dont la chélation ne permet pas la benzylation dans les conditions habituelles.

CHOPIN et DURUAL (165) ont ainsi pu préparer des benzyloxy-2' chalcones qui ont permis d'accéder aux époxides correspondants.

Il faut enfin souligner l'importance de la nature de l'halogénure d'alcoyle dans ces réactions de C-alcoylations. En milieu acétonique et en présence de carbonate de potassium, seul l'iodure de méthyle permet une C-méthylation de la phloracétophénone (164) et ceci conduit à penser que la C-benzylation par le chlorure de benzyle qui n'a lieu qu'en présence d'iodure de sodium,

doit résulter d'une réaction d'échange d'halogène, l'équilibre étant constamment déplacé vers l'iodure de benzyle seul capable de réagir avec le carbanion:



## PARTIE EXPERIMENTALE

1. Dibenzylloxy-2,4 phloracétophénone

1.1 dans l'acétone anhydre

5 g (0,03 moles) de phloracétophénone anhydre préparée selon la technique de HOESCH (166) sont dissous dans 100 cm<sup>3</sup> d'acétone anhydre dans un ballon de 250 cm<sup>3</sup>. On ajoute 12 g (0,095 moles) de chlorure de benzyle redistillé sous pression réduite et 15 g de carbonate de potassium desséché 24 heures à l'étuve à 110°C.

On maintient le chauffage à reflux 18 heures. Après filtration chaude, lavage du carbonate à l'acétone, les solutions acétoniques réunies sont concentrées à 50 cm<sup>3</sup>. Un entraînement à la vapeur d'eau élimine l'excès de chlorure de benzyle. Il se dépose après refroidissement un solide blanc qui est filtré, lavé et séché (3 g). Le solide est recristallisé deux fois de l'éthanol: on obtient finalement 2,5 g (rendement: 25 %) d'un solide blanc en fines aiguilles, homogène en chromatoplaque sur gel de silice G (Rf 0,90 dans benzène-acétate d'éthyle 4:1)

Fusion: 98-99°C (litt. 99°C) (155)

Analyse  $C_{22}H_{20}O_4$  Calc. % C: 75,84 H: 5,79  
Tr. 76,46 5,83

Spectre U.V.  $\lambda$   $C_2H_5OH$ : 225 m $\mu$  (log  $\epsilon$  : 4,32):  
max (log  $\epsilon$  : 4,17)

Spectre I.R. (KBr)  $\nu_{OH}$  : 3448  $\text{cm}^{-1}$   
 $\nu_{C=O}$  : 1618  $\text{cm}^{-1}$

## 1.2 dans le diméthylformamide (D.M.F.)

5 g de phloracétophénone dans 30 cm<sup>3</sup> de D.M.F. avec 8 g de chlorure de benzyle (0,063 moles) et 20 g de carbonate de potassium sont chauffés au reflux pendant une heure et demie. La masse réactionnelle est versée sur glace. Il se forme un produit gommeux qui peu à peu se solidifie. On obtient 5 g de di-O-benzyl-2,4 phloracétophénone (rendement 50 %).

2. Hydroxy-2' tétrabenzyl-3,4,4',6' chalcone

On dissout d'une part 5 g (environ 0,015 moles) de di-O-benzyl-2,4 phloracétophénone dans 20 cm<sup>3</sup> d'éthanol et d'autre part 4,6 g d'aldéhyde protocatéchique dibenzylé (0,015 moles), préparé à partir du pipéronal et benzylé dans l'éthanol, dans 20 cm<sup>3</sup> du même solvant. Les solutions alcooliques légèrement tièdes sont réunies et on ajoute 10 cm<sup>3</sup> de soude 50 %. La solution est agitée à la main pendant quelques instants et il se forme un précipité orange qui prend en masse. L'ensemble est laissé au repos 24 heures, puis on ajoute 100 cm<sup>3</sup> d'eau environ et on neutralise par l'acide chlorhydrique en refroidissant dans un bain de glace. Le solide jaune est filtré, lavé à l'eau, essoré. On recristallise de l'alcool et du benzène. Poids 7,2 g (rendement: 79 %).

Analyse: C<sub>43</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub> Calc. % C: 79,63 H: 5,55  
Tr. 80,14 5,59

Spectre U.V.  $\lambda_{\text{max}}^{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$  : 250 m  $\mu$  (log  $\epsilon$  : 3,96); 377 m  $\mu$  (log  $\epsilon$  : 4,08)

Spectre I.R. (KBr)  $\nu_{\text{C=O}}$  : 1615 cm<sup>-1</sup>

### 3. Hydrogénolyse de la chalcone tétrabenzylée

2 g de chalcone sont mis en suspension dans 50 cm<sup>3</sup> d'éthanol avec 100 mg de charbon palladié à 5 %. On fait passer l'hydrogène jusqu'à cessation d'absorption (350 cm<sup>3</sup>). Le catalyseur est éliminé par filtration et la solution alcoolique est concentrée à 10 cm<sup>3</sup>; puis elle est additionnée d'une solution hydroalcoolique d'acétate de plomb. Le précipité rouge formé est centrifugé, lavé au benzène et à l'alcool. Il est ensuite mis en suspension dans l'éthanol et l'on fait passer un courant d'hydrogène sulfuré. Le sulfure de plomb est filtré et la solution concentrée.

Le résidu est repris dans le système acétate d'éthyle-hexane normal-eau-éthanol(6:4:5,5:4,5) et distribué dans l'appareil de CRAIG (40 transferts), les fractions 15 à 30- les plus riches en produits sont réunies et concentrées.

### 4. Pentaacétoxy-3,4,2',4',6', dihydrochalcone

0,4 g du résidu de la concentration sont dissous dans 5 cm<sup>3</sup> d'anhydride acétique et 5 cm<sup>3</sup> de pyridine. La solution est conservée deux jours à la température ordinaire, puis chauffée une heure au bain-marie bouillant.

Le mélange est versé sur glace et le précipité formé est centrifugé. Il est recristallisé du mélange acétate d'éthyle-hexane normal. Après trois recristallisations, le R<sub>f</sub> sur gel de silice G dans benzène-dioxane-acétate d'éthyle est de 0,65.

|                                                         |                  |         |
|---------------------------------------------------------|------------------|---------|
| Analyse C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub> | Calc. % C: 60,00 | H: 4,83 |
|                                                         | Tr. 59,31        | 4,96    |

Spectre I.R.  $\nu_{\text{OAc}}$ : 1760 cm<sup>-1</sup>

### 5. Débenzylation de la chalcone tétrabenzylée par le chlorure d'aluminium.

2 g de chalcone sont dissous dans 10 cm<sup>3</sup> de benzène et ajoutés à une solution de 8 g de chlorure d'aluminium fraîchement sublimé dans 50 cm<sup>3</sup> d'éther. La solution rouge est conservée 12 heures à la température ordinaire. Elle est ensuite versée dans 400 cm<sup>3</sup> d'eau glacée contenant 10 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique. On laisse au repos 24 heures puis on fait barboter de l'azote pour éliminer l'excès d'éther et de benzène. La solution aqueuse, contenant un précipité brun foncé, est extraite à l'acétate d'éthyle, la phase organique est concentrée et reprise dans l'alcool. On ajoute une solution hydroalcoolique d'acétate neutre de plomb. Il se forme un précipité orange qui est centrifugé, puis lavé au benzène et à l'alcool.

La solution alcoolique - non précipitée- est réunie aux solutions de lavage et concentrée: elle contient surtout la chalcone n'ayant pas réagi.

Le précipité est mis en suspension dans l'éthanol et régénéré par l'hydrogène sulfuré. Le sulfure de plomb est filtré et la solution alcoolique concentrée à un faible volume. Par chromatographie sur gel G on observe deux taches principales de R<sub>f</sub> 0,13 et 0,32 révélables en magenta par le borohydrure de potassium et l'acide chlorhydrique, le solvant étant benzène-acétate d'éthyle (4:1). Il s'agit donc de flavanones, et l'ériodictyol témoin a d'ailleurs un R<sub>f</sub> de 0,13 également.

### 6. Hydrolyse de l'hespéridine

26,5 g d'hespéridine sont mis en suspension dans 500 cm<sup>3</sup> d'acide acétique 50 % avec 25 cm<sup>3</sup> d'acide perchlorique. La suspension est chauffée au bain-marie bouillant jusqu'à dissolu-

tion (2 heures). La solution est alors versée dans 2.500 cm<sup>3</sup> d'eau et laissée au repos une nuit. Il se forme un précipité brun clair qui est filtré, lavé à l'eau et séché. Poids 11,5 g (rendement 87 %).

L'hespérétine est recristallisée de l'isopropanol (4 g dans 25 cm<sup>3</sup> de solvant) avec un rendement de 61 % (F.: 222-4°C).

### 7. Déméthylation de l'hespérétine

0,5 g d'hespérétine sont mélangés intimement à 1,5 g de chlorhydrate de pyridine dans un tube où l'on peut faire le vide. On chauffe au bain métallique pendant une heure à 180°C sous vide de la trompe à eau.

Après refroidissement on reprend par l'eau la masse réactionnelle brune et on extrait à l'éther. La phase éthérée est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium, puis concentrée à sec. Le résidu repris dans l'alcool donne un précipité rouge lorsqu'on ajoute une solution d'acétate neutre de plomb. Le précipité est centrifugé, lavé à l'alcool et remis en suspension dans l'éthanol. Le chélate est détruit par l'hydrogène sulfuré et après filtration du sulfure, la solution obtenue donne une réaction positive au magnésium chlorhydrique. La chromatographie en couche mince sur gel de silice G montre qu'elle contient un peu d'ériodictyol (Rf 0,13 dans benzène-acétate d'éthyle 4:1) à côté de nombreuses impuretés.

### 8. Mono-C-benzyl-3 di-O-benzyl-2,4 phloracétophénone.

Dans un ballon de 250 cm<sup>3</sup> on chauffe à reflux pendant trente heures 5 g (0,03 moles) de phloracétophénone dissous dans 100 cm<sup>3</sup> d'acétone anhydre, avec 18 g (0,14 moles) de chlorure de benzyle, 15 g de carbonate de potassium sec et 100 mg environ

d'iodure de sodium. Après filtration chaude, lavage du carbonate à l'acétone, les solutions acétoniques réunies et concentrées sont entraînées à la vapeur d'eau. Il se forme un produit solide brun clair qui est filtré, lavé, essoré. Après recristallisation du méthanol il fond à 123-4°C (aiguilles blanches). Poids: 3,2 g (rendement 25 %). Il donne une seule tache en chromatographie plaque sur gel de silice G; Rf 0,97 dans benzène-acétate d'éthyle (4:1).

Analyse:  $C_{29}H_{26}O_4$       Calc. % C: 79,59      H: 5,98  
Tr.                      79,43                      5,98

Spectre U.V.  $\lambda_{\text{max.}}^{C_2H_5OH}$  : 230 m $\mu$  (log  $\epsilon$  : 4,14); 290 m $\mu$  (log  $\epsilon$  : 4,33)  
inf. 330 m $\mu$  (log  $\epsilon$  : 3,54)

Spectre I.R. (KBr)  $\nu_{C=O}$  : 1618  $cm^{-1}$

## 9. Acétate du dérivé tribenzylé

0,5g de mono-C-benzyl-3 di-O-benzyl-2,4 phloracétophénone sont dissous dans 20 cm<sup>3</sup> d'anhydride acétique avec 0,1 g d'acétate de sodium.

Après chauffage à reflux pendant deux heures le mélange est versé sur glace. Il se forme un précipité blanc qui est filtré et lavé à l'eau. Deux recristallisations dans l'alcool donnent un produit fondant à 128-9°C, cristallisé en aiguilles blanches (400 mg).

Analyse  $C_{31}H_{28}O_5$       Calc. % C: 77,48      H: 5,87  
Tr.                      76,87                      5,86

Spectre U.V.  $\lambda_{\text{max.}}^{C_2H_5OH}$  : 256 m $\mu$  (log  $\epsilon$  : 3,94); 302 m $\mu$  (log  $\epsilon$  : 3,54)

Spectre I.R.  $\nu_{C=O}: 1675 \text{ cm}^{-1}$

$\nu_{OAc}: 1740 \text{ cm}^{-1}$

#### 10. Saponification de l'acétate

Quelques milligrammes de cet acétate sont dissous à chaud dans la soude alcoolique 2N. Les réactifs sont laissés en contact 5 minutes puis on acidifie par l'acide chlorhydrique. Il apparaît un trouble blanc et la solution aqueuse est extraite à l'éther. La couche étherée est lavée à l'eau, puis concentrée. Le résidu repris par l'éthanol donne des cristaux fondant à  $121-2^{\circ}\text{C}$  dont le spectre I.R. est identique à celui de la phloracétophénone tribenzylée.

#### 11. Benzyl-3 phloracétophénone.

2 g de phloracétophénone tribenzylée sont mis en suspension dans 75 cm<sup>3</sup> d'éthanol avec 0,1 g environ de charbon palladié à 5 %. On fait absorber 410 cm<sup>3</sup> d'hydrogène sous agitation. Au cours de la réaction le produit s'est solubilisé; le catalyseur est filtré et la solution éthanolique concentrée. La mono C-benzyl phloracétophénone cristallise spontanément en fines aiguilles. On obtient après deux recristallisations dans l'alcool 0,93 g. F.  $207-8^{\circ}\text{C}$

|                                                |                  |         |
|------------------------------------------------|------------------|---------|
| Analyse $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$ | Calc. % C: 69,75 | H: 5,46 |
|                                                | Tr. 69,65        | 5,33    |

Spectre U.V.  $\lambda_{\text{max}}^{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}: 225 \text{ m}\mu (\log \epsilon: 4,15); 292 \text{ m}\mu (\log \epsilon: 4,21).$

Spectre I.R.  $\nu_{\text{OH}}: 3350 \text{ cm}^{-1}$   
 $\nu_{C=O}: 1630 \text{ cm}^{-1}$

### 12. Acétate de la benzyl-3 phloracétophénone

0,193 g du produit précédent sont dissous dans 20 cm<sup>3</sup> d'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium (0,1 g environ) et chauffés deux heures à reflux. On verse sur glace pour détruire l'excès d'anhydride acétique et il se forme alors un produit gommeux qui se solidifie lentement par trituration dans l'eau. Le solide est filtré, lavé à l'eau et cristallisé de l'éthanol. On obtient 0,2 g d'un produit fondant à 123-4°C (aiguilles blanches).

|         |                   |         |          |         |
|---------|-------------------|---------|----------|---------|
| Analyse | $C_{21}H_{20}O_7$ | Calc. % | C: 65,61 | H: 5,24 |
|         |                   | Tr.     | 65,60    | 5,31    |

Spectre U.V.  $\lambda_{\text{max}}^{C_2H_5OH}$  : 213 m $\mu$  (log  $\epsilon$  : 4,50); inf. à 243 m $\mu$   
(log  $\epsilon$  : 3,90 et 280 m $\mu$  (log  $\epsilon$  : 3,15)).

Spectre I.R.  $\nu_{C=O}$  : 1690 cm<sup>-1</sup>  
 $\nu_{OAc}$  : 1760 et 1740 cm<sup>-1</sup>

### 13. Benzylation de la benzyl-3 phloracétophénone

0,2 g de monobenzyl-3 phloracétophénone sont chauffés au reflux pendant 12 heures dans 20 cm<sup>3</sup> d'acétone anhydre, en présence de 0,3 g de chlorure de benzyle, 5 g de carbonate de potassium et une pointe de spatule d'iodure de sodium. Après filtration chaude, concentration de l'acétone et entraînement à la vapeur, le solide blanc formé est recristallisé de l'éthanol et identifié par fusion mélangée (123-4°C), chromatographie plaque et spectre I.R. à la benzyl-3 di-O-benzyl-2,4 phloracétophénone.

#### 14. Benzylation de la di-O-benzyl-2,4 phloracétophénone

1 g de produit est chauffé à reflux pendant 24 heures dans 50 cm<sup>3</sup> d'acétone en présence de 1 g de chlorure de benzyle, 5 g de carbonate de potassium et un peu d'iodure de sodium.

Après filtration et entraînement à la vapeur on obtint une gomme qui est reprise dans l'éthanol, mais que nous n'avons pu cristalliser dans aucun solvant.

Spectre U.V.  $\lambda_{\text{max}}^{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$  : 268 m $\mu$  (log  $\epsilon$  : 3,62)

Spectre I.R.  $\nu_{\text{C=O}}$  : 1675 cm<sup>-1</sup>

#### 15. Tribenzyloxy-2',4',6' chalcone

La solution chaude dans l'alcool d'environ 0,5 g de cette gomme est versée dans une solution alcoolique de 0,150 g d'aldéhyde benzoïque. On ajoute 5 cm<sup>3</sup> de potasse 50 %. Il se forme un précipité jaune; le mélange est laissé au repos 24 heures, puis additionné d'eau et neutralisé par l'acide chlorhydrique. La gomme formée ici encore est séparée des eaux-mères et recristallisée facilement de l'éthanol. Après quatre cristallisations on obtient 0,2 g de cristaux en fines aiguilles jaunes fondant à 131-2°C de Rf 0,23 en chromatoplaque sur gel de silice G dans benzène-éther de pétrole (4:1).

|                                                |                  |         |
|------------------------------------------------|------------------|---------|
| Analyse $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_4$ | Calc. % C: 82,10 | H: 5,74 |
|                                                | Tr. 82,03        | 5,82    |

Spectre U.V.  $\lambda_{\text{max}}^{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$  : 298 m $\mu$

Spectre I.R.  $\nu_{\text{C=O}}$  : 1650 cm<sup>-1</sup>

### 16. Hydrogènoolyse de la tri-O-benzyl phloracétophénone

La tri-O-benzyl phloracétophénone gommeuse est mise en suspension dans l'éthanol avec du charbon palladié à 5 %. On fait passer un courant d'hydrogène, sous agitation, jusqu'à cessation d'absorption. Le catalyseur est filtré, la solution concentrée à sec et le résidu cristallisé de l'eau. Le produit obtenu ne présente pas d'abaissement de point de fusion par mélange avec la phloracétophénone (218°C) et les spectres I.R. sont identiques.

### 17. Di-O-benzyl-2,4 résacétophénone.

5 g de résacétophénone (0,033 moles) dissous dans 100 cm<sup>3</sup> d'acétone avec 18 g de chlorure de benzyle (100 % d'excès), 15 g de carbonate de potassium et 0,1 g d'iodure de sodium sont chauffés à reflux pendant 18 heures. Après les opérations classiques de filtration chaude et d'entraînement à la vapeur, il se forme un produit gommeux qui est repris dans l'éthanol. La cristallisation est facile et on obtient 5,5 g d'un produit sous forme d'aiguilles blanches fondant à 84°C.

|                           |                 |         |
|---------------------------|-----------------|---------|
| Analyse $C_{22}H_{20}O_3$ | Calc. % C:79,49 | H: 6,06 |
|                           | Tr. 79,51       | 6,04    |

Spectre U.V.  $\lambda_{\text{max}}^{C_2H_5OH}$  : 229 m $\mu$ (log  $\epsilon$  : 4,38); 265 m $\mu$ (log  $\epsilon$  : 4,27);  
295 m $\mu$ (log  $\epsilon$  : 3,90).

Spectre I.R.  $\nu_{C=O}$  : 1655 cm<sup>-1</sup>

Dans les mêmes conditions si l'on utilise la quantité théorique de chlorure de benzyle, soit 9 g, il se forme 3,8 g de dérivé monobenzylé (F.111°C) et 2,3 g de dérivé dibenzylé, que l'on sépare par cristallisation de l'éthanol.

18. Débenzylation de la di-O-benzyl-2,4 résacétophénone

2 g de résacétophénone dibenzylée sont dissous dans 10 cm<sup>3</sup> de D.M.F.; on ajoute 0,1 g environ de charbon palladié à 5 %. On fait passer l'hydrogène jusqu'à cessation d'absorption. Le catalyseur est filtré et la solution additionnée d'eau. Le précipité formé est recristallisé de l'alcool en plaquettes brillantes dont le point de fusion et le spectre I.R. sont identiques à ceux de la monobenzyl-4 résacétophénone.

## CONCLUSIONS GENERALES

---

Notre travail a été consacré à l'étude de la nature des constituants flavoniques d'un extrait d'écorce de Citron. Ces extraits, présentant des propriétés thérapeutiques intéressantes, n'avaient donné lieu qu'à des analyses assez fragmentaires, sauf celle de la composition en aglycones récemment réalisée par HOROWITZ et GENTILI.

Pour effectuer cette analyse, nous avons d'abord étudié les procédés d'isolement et de caractérisation des composés flavoniques. Ceux que nous avons employés - en général bien connus - ont seulement été résumés; nous avons insisté plus particulièrement sur l'emploi de la distribution à contre-courant selon CRAIG et sur la détermination des structures à l'aide des spectres U.V.

Etant donné son extrême complexité, l'extrait éthanolique de l'écorce de Citron est tout d'abord séparé en deux fractions par précipitation à l'acétate de plomb.

En milieu neutre, seuls les dérivés ortho-dihydroxylés précipitent. Nous avons isolé par distribution à contre-courant et chromatographie préparative sur papier puis caractérisé :

- une flavanone, l'ériocitrine ou rutinoside-7 de l'ériodictyol; déjà identifiée dans le Citron;
- deux flavones: la lonicérine ou rhamnoglucoside-7 de la lutéoline isolée seulement de Lonicéra japonica et un nouveau C-glycoside de lutéoline;
- un flavonol, le diglucoside-3,5 de la quercétine non encore connu à l'état naturel;
- trois aurones: un rhamnoglucoside-6 de l'aureusidine,

le glucoside-6 de l'auréusidine ou auréusine et enfin l'auréusidine elle-même, dont seule la seconde était connue à l'état naturel;

- et d'autre part le  $\beta$ -sitostérol et l'acide cafféique, le premier connu sous forme de glucoside et le second non encore décrit dans l'écorce de Citron.

En milieu alcalin, nous obtenons une nouvelle fraction dont les constituants sont séparés par chromatographie sur colonne de cellulose puis sur papier, et qui est riche en flavonols. En effet nous y trouvons:

- un arabinoglucoside-3 de l'isorhamnétine
- un arabinoglucoside-3 de la limocitrine
- un arabinodiglucoside-3 du limocitrol

dont aucun n'était connu à l'état naturel.

Cette fraction contient également une flavanone, l'hespéridine, en quantité importante; deux C-glycosides de flavones inconnus à ce jour, l'un d'apigénine (différent de la vitexine et de la saponarétine) et l'autre de diosmétine. En outre deux acides hydroxycinnamiques : l'acide p.coumarique et l'acide férulique dont seul le premier avait été isolé du Citron.

Nous avons donc montré que tous les composés flavoniques présents dans l'extrait d'écorce de Citron existent sous forme de glycoside et nous avons pu préciser à la fois la nature des sucres et leurs positions d'attache sur les aglycones. Nous avons pu ainsi mettre en évidence pour la première fois trois faits particulièrement intéressants:

- la présence d'arabinose dans les glycosides du Citron
  - l'existence de tous les flavonols sous forme de glycosides en 3
  - l'existence de C-glycosides flavoniques dans le Citron.
- Parmi les glycosides que nous avons identifiés, l'hes-

péridine et l'ériocitrine sont les plus importants et nous avons essayé de synthétiser par une nouvelle voie l'aglycone de cette dernière: l'ériodictyol.

Pour cela nous avons formé l'hydroxy-2' tétrabenzyl-3, 4,4',6' chalcone en partant de la di-O-benzyl-2,4 phloracétophénone et de l'aldéhyde protocatéchique di-benzylé; mais les essais de cyclisation ont été infructueux.

Au cours de la synthèse de cette chalcone nous avons été amené à observer une réaction de benzylation anormale de la phloracétophénone, lorsque celle-ci est effectuée par le chlorure de benzyle, en présence d'iodure de sodium, dans l'acétone anhydre avec du carbonate de potassium. On obtient alors un dérivé C-benzylé: la C-benzyl-3 di-O-benzyl-4,6 phloracétophénone.

Par contre si l'on benzye dans les mêmes conditions la résacétophénone ou la di-O-benzyl-2,4 phloracétophénone on observe en aucun cas de benzylation nucléaire, mais on peut alors atteindre avec de bons rendements les dérivés entièrement O-benzylés. En particulier les groupements phénoliques en ortho d'un groupe carbonyle peuvent être ainsi protégés.

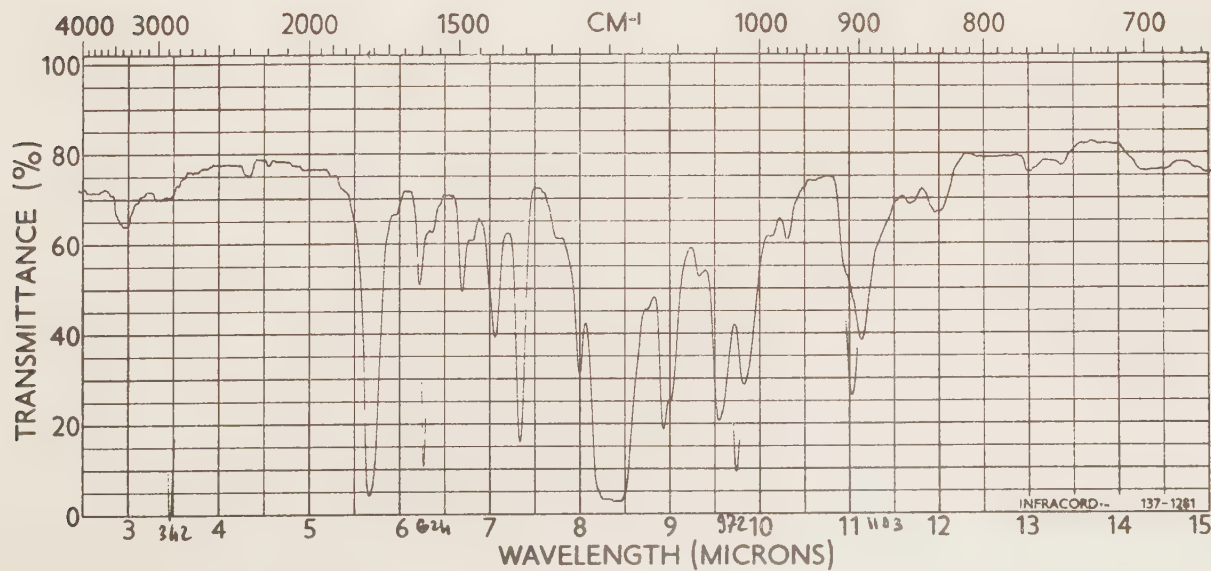
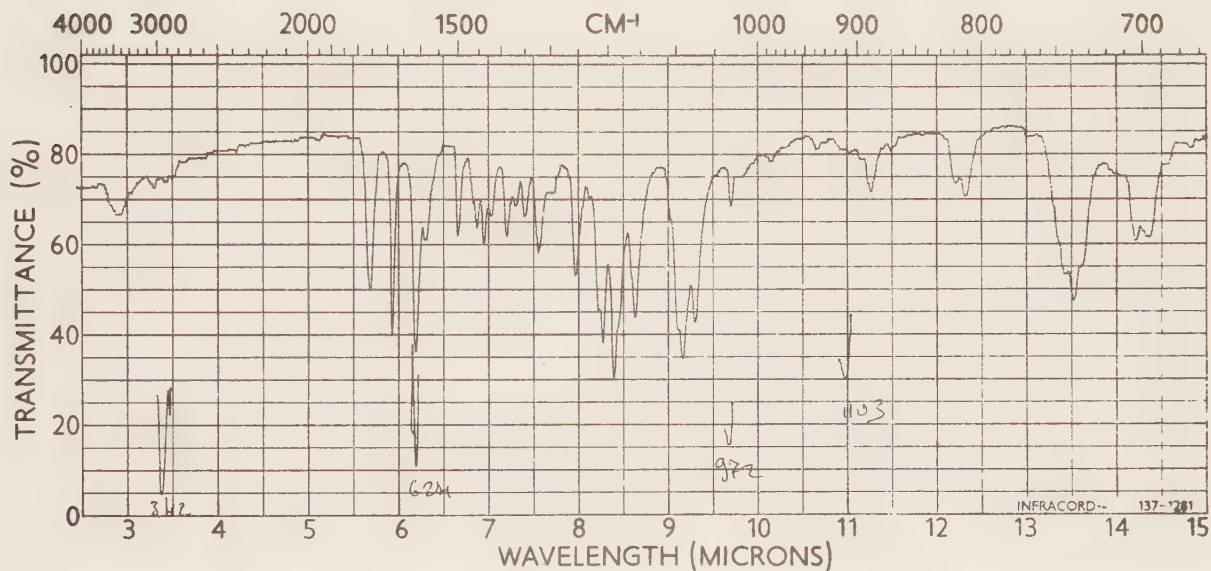
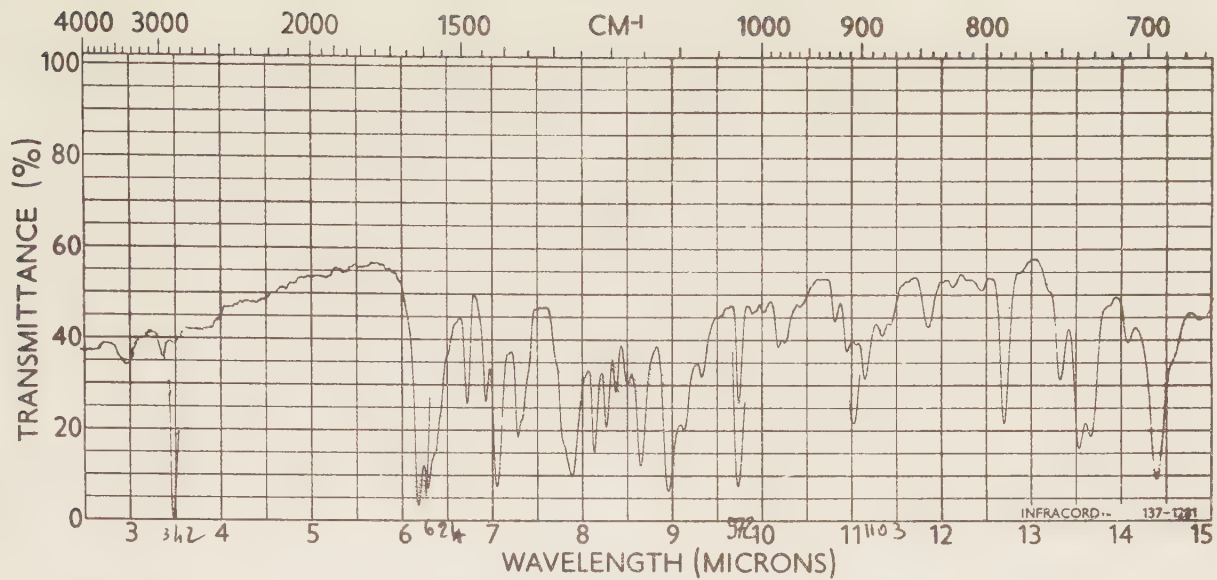
SPECTRES INFRA-ROUGE

---

Spectre n°1    Benzyl-3 di-o-benzyl-2,4 phloracétophénone

Spectre n°2    Monoacétate de la benzyl-3 di-O-benzyl-2,4  
phloracétophénone

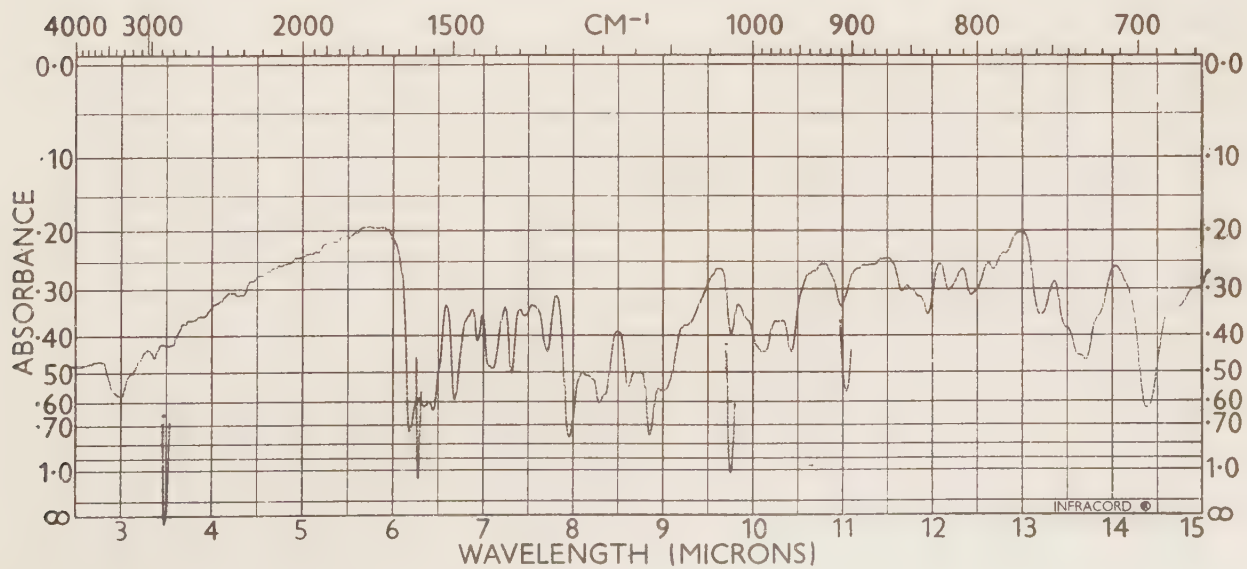
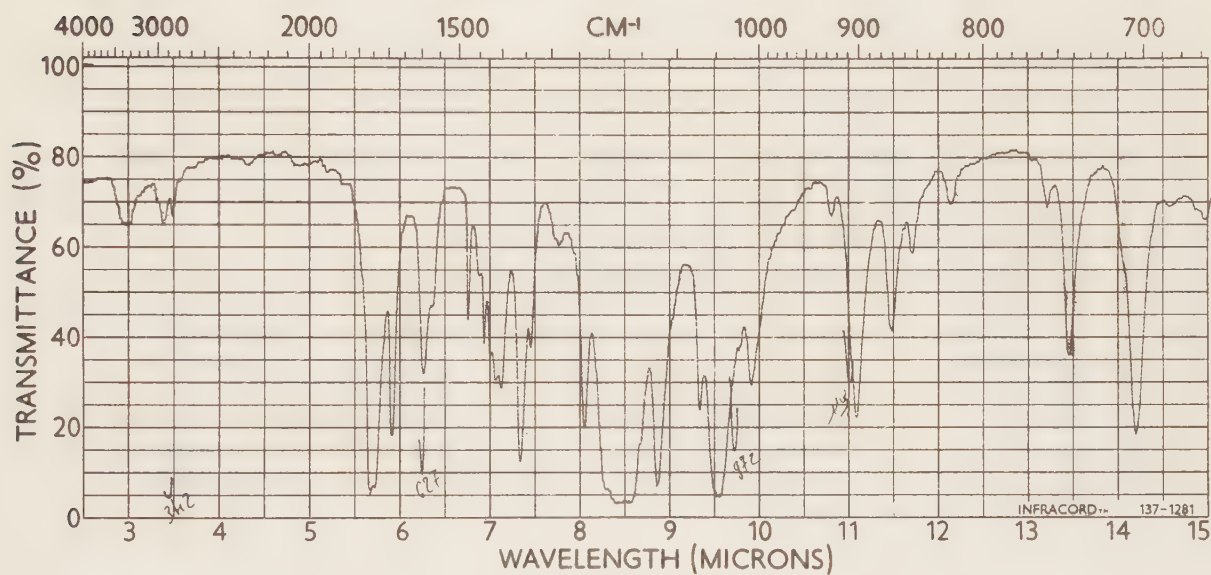
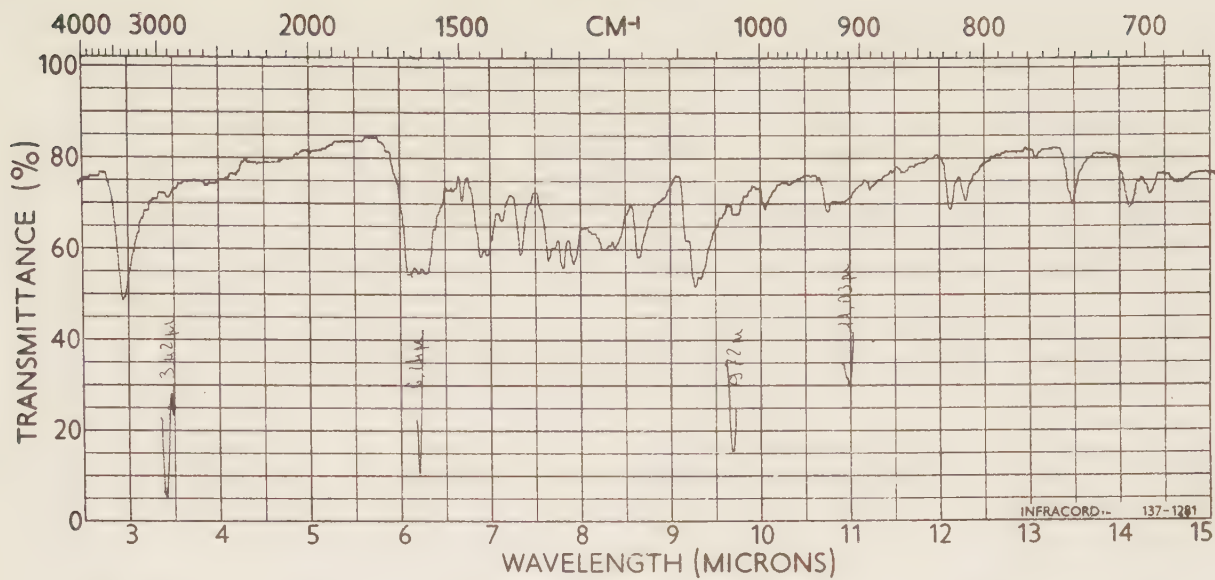
Spectre n°3    Penta acétoxy-3,4,2',4',6' di-hydrochalcone



Spectre n°4 C.Benzyl-3 phloracétophénone

Spectre n°5 Triacétate de la benzyl-3 phloracétophénone

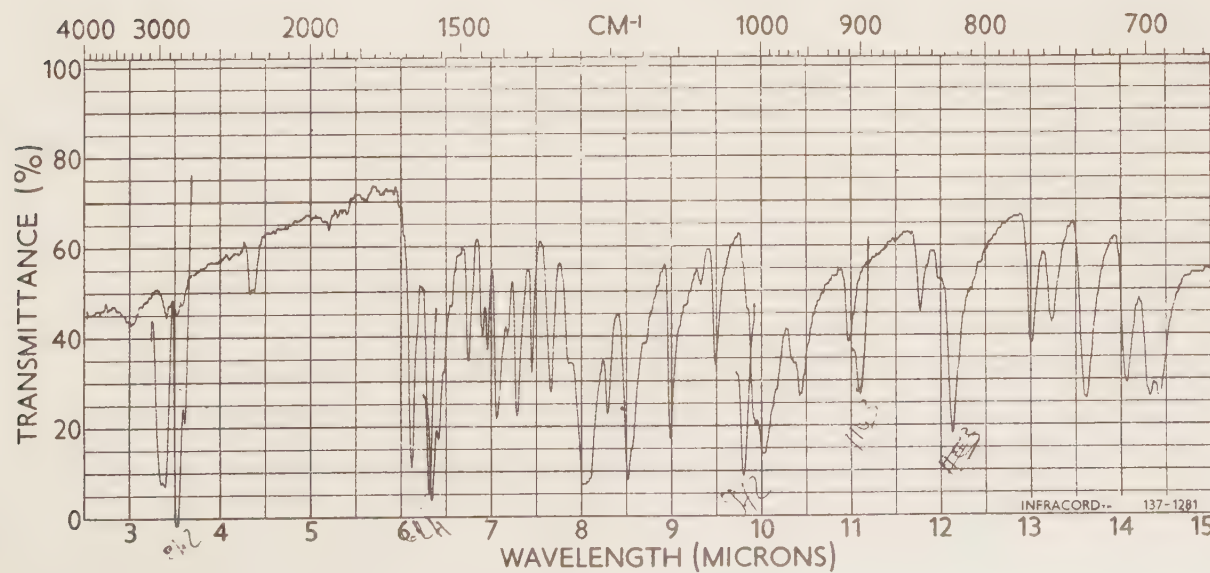
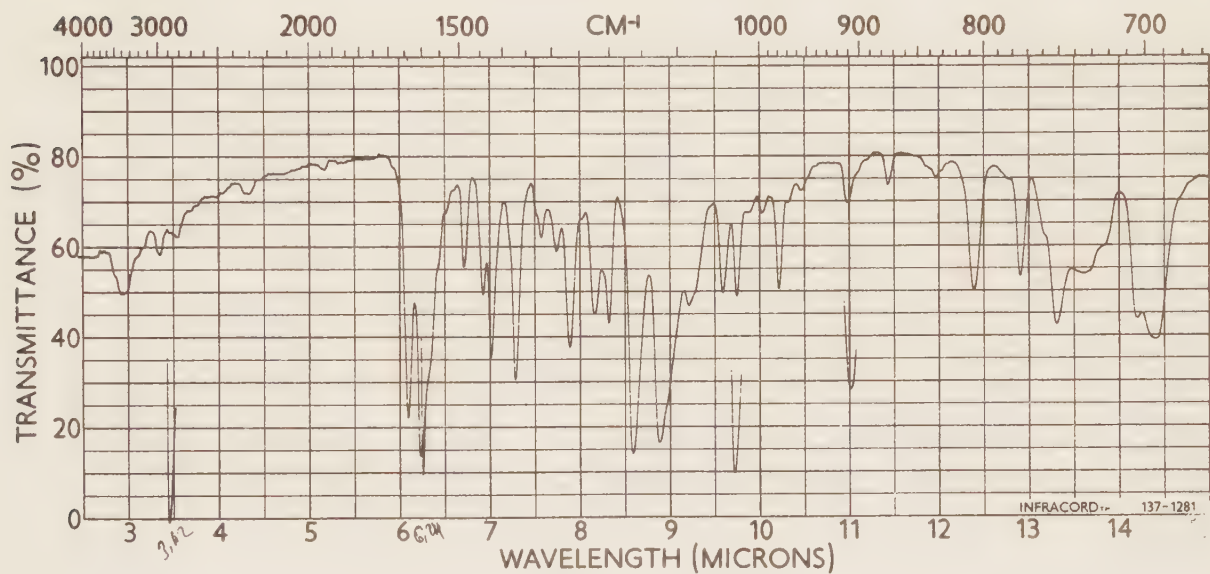
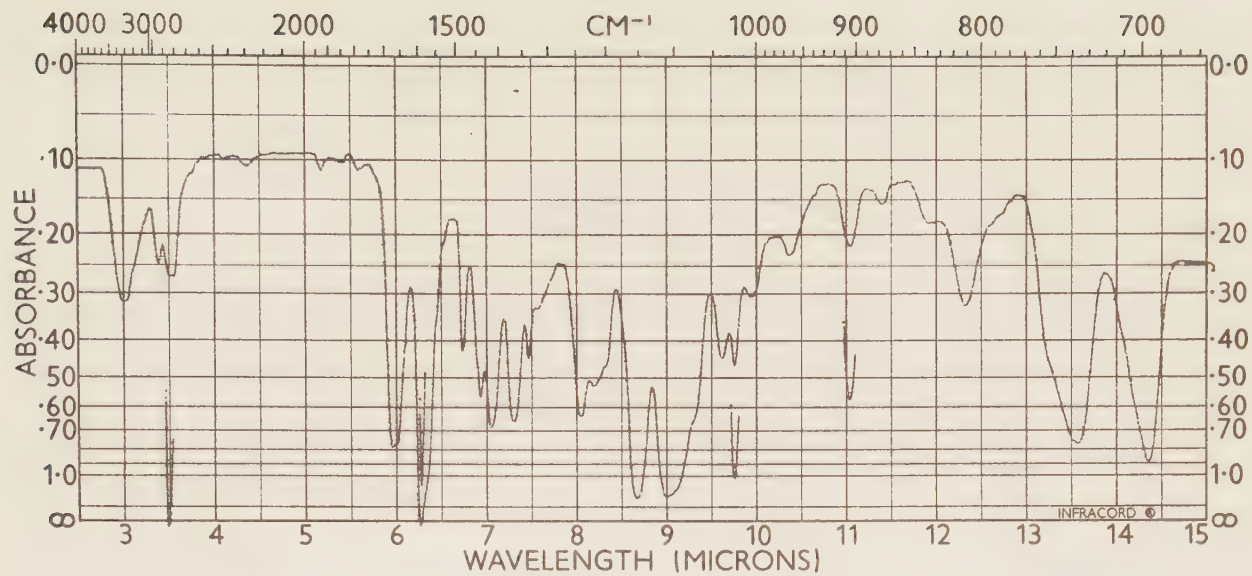
Spectre n°6 Hydroxy-2' tetrabenzyl-3,4,4',6' chalcone



Spectre n°7      Tri-benzyl-2,4,6 phloracétophénone

Spectre n°8      Tri-benzyloxy-2',4',6' chalcone

Spectre n°9      Di-O-benzyl-2,4 résacétophénone





## BIBLIOGRAPHIE

- (1) W.Y. GARY Flo.Dept.Agr.Chem.Division 1955 1 17
- (2) P.S. SARIN et T.R. SESHADRI, Tetrahedron 1960 8 64
- (3) R.N. KHAMNA et T.R. SESHADRI, Tetrahedron 1963 19 219
- (4) N.F. GRUNDON et N.G. NEILL, J.Chem.Soc 1952 4580
- (5) L.R. ROW et C.V.R. SASTRY, Tetrahedron 1963 19 1371
- (6) S. HATTORI, M. SHIMOKORIYAMA et M. KANAO, J.Am.Chem.Soc.1952  
74 3614
- (7) R.M. HOROWITZ, J.Org.Chem. 1956 21 1184
- (8) P. VENTUNELLA, A. BELLINO et S. CUSMANO, Ann.Chim.(Rome 1961  
51 105
- (9) C.F. CREWSON et J.F. COUCH, J.Am.Chem.Soc.1948 70 257
- (10) M. HATA Japan 11.200 5 Août 1960
- (11) J.B. HARBORNE, Phytochem. 1963 2 327
- (12) T.A. GEISSMAN dans K. PAECH et M.V. TRACEY, Modern Methods of  
Plants Analysis (III) Heidelberg 1955
- (13) S.R. GUPTA et T.R. SESHADRI, Proc.Ind.Acad.Sci.1952 35 242
- (14) M.O. FAROOQ, S.R. GUPTA, M. KIAMYDDIN, W. REHMAN et T.R. SESHADRI  
J.Sci.Ind.Research (Inde) 1953 12B 400
- (15) E.C. BATE-SMITH, Nature 1948 161 835
- (16) E.C. BATE-SMITH, Biochem.Soc.Symposia(Cambridge)1949 3 62
- (17) T.B. GAGE, C.D. DOUGLAS et S.H. WENDER, Anal.Chem.1951 23 1582
- (18) H.W. CASTEEL et S.H. WENDER, Anal.Chem. 1953 25 208
- (19) B.L. WILLIAMS et S.H. WENDER, J.am.Chem.Soc.1952 74 5919
- (20) R.A. PARIS, Bull.Soc.Chim.Biol. 1952 34 767
- (21) J.B. HARBORNE, J.Chromato. 1959 2 581
- (22) E.C. BATE-SMITH et R.G. WESTALL, Biochem.Biophys.Acta 1950 4  
427
- (23) M.K. SEIKEL dans T.A. GEISSMAN, The Chemistry of Flavonoid  
Compounds Pergamon Press New-York 1962 p.34
- (24) C.G. NORDSTROM et T. SWAIN, Chem.and Ind.(London)1953 823
- (25) C.A. WACHTMEISTER, Acta Chem.Scand. 1951 5 976

- (26) M.K. SEIKEL, J.Am.Chem.Soc. 1955 77 5685
- (27) R.L. HOSSFELD, J.Am.Chem.Soc.1951 73 852
- (28) E.A.H.ROBERTS,R.A. CARTWRIGHT et D.J. WOOD,J.Sci.Foo Agr.1956  
7 637
- (29) E.A.H.ROBERTS et D.J. WOOD, Biochem.J. 1953 53 332
- (30) C.G. LINDSTEDT, Acta Chem.Scand. 1950 4 448
- (31) E. EIGER,M. BLITZ et E. GUNSBURG,Arch.Biochem.Biophys.1957 68
- (32) P.N. CAMPBELL,T.S. WORK et E. MELLANBY,Biochem.J.1951, <sup>501</sup>  
48 106
- (33) W.G.C. FORSYTH, Biochem.J. 51 511
- (34) R.M. HOROWITZ et B. GENTILI, J.Org.Chem. 1960 25 2183
- (35) B.L. WILLIAMS et S.H. WENDER, J.Am.Chem.Soc.1952 74 4372
- (36) B.L. WILLIAMS et S.H. WENDER, J.Am.Chem.Soc.1953 75 4363
- (37) E.C. BATE-SMITH et T.S. SWAIN,J.Chem.Soc. 1953 2185
- (38) D.W. FOX,W. SAVAGE et S.H. WENDER,J.Am.Chem.Soc.1953 75 2504
- (39) R. VANCRAENENBROECK,A. ROGERST,H. LEMAITRE et R. LONTIE,  
Bull.Soc.Chim.Belg; 1963 72 619
- (40) W. GRASSMAN,H. ENDRES,W. PAUCKNER et H. MATHIS,Chem.Ber.1957  
90 1125
- (41) R. NEU , Nature 1958 182 660
- (42) E. STAHL, Dünnschicht Chromatographie Springer-Verlag  
Heidelberg 1962
- (43) K. RANDEKATH, Chromatographie en couche mince,Gauthier-Villars  
Paris 1964
- (44) J.E. GAREL,Bull.Soc.Chim.1964 653
- (45) E. STAHL et P.J. SCHORN, Hoppe Seyler's Z.physiol.1961 325 263
- (46) G.O.P. DOHERTY,N.B. HAYNES et W.B. WHALLEY,J.Chem.Soc.1963 5577
- (47) E. EGGER, Z.analyt.chem. 1961 182 161
- (48) L.C. CRAIG et D. CRAIG dans A. WEISSBERGER,Technics of Organic  
Chemistry (III) Interscience Publishers New-York
- (49) D. PILLON, Bull.Soc.Chim. 1952 1107.
- (50) B. WILLIAM et L.C. CRAIG, J.Biol.Chem. 1947 168 687
- (51) E. HECKER, Verteilungsverfahren im Laboratorium Wienhiem/  
Bergst 1955

- (52) M.T. BUSH et P.M. DENSEN, Ind.Eng.Chem.(Anal.Ed.) 1948 20 121
- (53) L.C. CRAIG, Anal.Chem. 1951 13 1236
- (54) G.T. BARRY,Y. SATO et L.C. CRAIG,J.Biol.Chem.1948 174 209
- (55) L. HÖRHAMMER et H. WAGNER, Archiv.Pharm. 1956 289 532
- (56) L. HÖRHAMMER et H. WAGNER, Archiv.Pharm. 1957 290 224
- (57) D.G. ROUX et E. PAULUS, Biochem.J. 1961 78 120
- (58) A. TSCHESCHE et H.B. KONIG , Chemie Ing.Techn.1950 22 214
- (59) K. WEINIGES, Ann. 1959 627 229
- (60) J.W. CLARK-LEWIS,G.F. KATEKAR et P.I. MORTIMER,J.Chem.Soc.1961 499
- (61) J. SHINODA, J.Pharm.Soc.Japan 1928 48 214
- (62) J.C. PEW, J.Am.Chem.Soc. 1948 70 3031
- (63) H. PACHECO et M. CHADENSON,C.R.Acad.Sci.1956 242 1621
- (64) H. PACHECO, Bull.Soc.Chim. 1956 1600
- (65) M. MURTI,V.RAJOGOPALAN,et L.R. ROW,Proc.Ind.Acad.Sci.1951 34 319
- (66) RAO et T.R. SESHADRI,Proc.Ind.Acad.Sci. 1949 30 30
- (67) G.B. MARINI-BETTOLIO et A. BALLIO, Gazz.Chim.Ital.1946 76 410
- (68) G. LINDSTEDT et A. MISIORNY,Acta Chim.Scand. 1951 5 1,121
- (69) A. MAURICE et C. MENTZER,Bull.Soc.Chim.Biol. 1951 36 169
- (70) A. STAMBOULI et R. PARIS, Ann.Pharm. 1961 19 435
- (71) J.H. LOOKER et M.J. JOHN, J.Org.Chem.1960 25 1829
- (72) M.K. SEIKEL,AJ. BUSHNELL et R. BIRZGALIS, Arch.Biochem.Biophys.  
1962 99 451
- (73) H. SUZUKI, Arch.Biochem.Biophys. 1962 99 476
- (74) L. JURD dans T.A. GEISSMAN, The Chemistry of Flavonoïd Compounds
- (75) T. SWAIN, Chem.and Ind.(London) 1954 1480
- (76) J.B. HARBORNE, Chem.and Ind.(London) 1954 1142
- (77) T.A. GEISSMAN et L. JURD, Arch.Biochem.Biophys.1955 59 259
- (78) L. HORHAMMER et R. HANSEL, Archiv.Pharm. 1953 286 125, 447
- (79) L. JURD,T.A. GEISSMAN et M.K. SEIKEL,Archiv.Biochem.Biophys.1957  
67 284
- (80) G.H. MANSFIELD,T.SWAIN et G.C.NORDSTROM, Nature 1953 172 23
- (81) G.C. NORDSTROM et T. SWAIN, J.Chem.Soc. 1953 2764

- (82) L. JURD et R.M. HOROWITZ, J.Org.Chem. 1957 22 1618
- (83) T.A. GEISSMAN, E.C. JORGENSEN et J.B. HARBORNE, Chem. and Ind. (London) 1953 1389
- (84) H.L. HERGERT et O. GOLDSCHMID, J.Org.Chem. 1958 23 700
- (85) R.M. HOROWITZ et L. JURD, J.Org.Chem. 1961 26 2446
- (86) H. SCARBOROUGH et BACHARAH dans HARRIS et THIMANN Vitamins and Hormons VII, Acad. Press Inc. NEW-YORK 1949
- (87) S. RUSYNYAK et A. SZENT-GYORGYI, Nature 1936 138 27
- (88) S. RUSYNYAK et A. SZENT-GYORGYI, Nature 1936 138 1057
- (89) A. SZENT-GYORGYI, Z. Physiol. Chem. 1938 255 126
- (90) H. SCARBOROUGH, Biochem. J. 1945 39 276
- (91) J. LAVOLLAY, Recherches sur la Vitamine P  
Congrès Assoc. Franc. Avanc. Sci. PARIS 1945 3 367
- (92) M.S. MASRI et F. DE EDS, Proc. Soc. Exp. Research 1959 9 286
- (93) A.M. BOOTH, C.W. MURRAY, F.T. JONES et F. DE EDS, J. Biol. Chem. 1958 233 280
- (94) R.T. WILLIAMS dans J.W. FAIRBAIRN, The Pharmacology of Plant Phenolics, Acad. Press NEW-YORK 1959
- (95) J.F. KEFFORD, Advances in Food Research 1959 9 286
- (96) J.W. KESTERSON et R. HENDRICKSON, Univ. Florida Agr. Expt. Sta. Bull. 1953 511 5
- (97) E. HOFFMAN, Ber. 1876 9 690
- (98) S. HATTORI, M. SHIMOKORIYAMA et M. KANAO, J. Am. Chem. Soc. 1959 74 3614
- (99) T. MATSUMO, Nippon Kagaku Zasshi 1959 79 547
- (100) N. ALVERTIS, Chem. Chronika 1958 23 26
- (101) M. SHIMOKORIYAMA, J. Am. Chem. Soc. 1957 79 4199
- (102) D. NOMURA, J. Fermentation Technol. 1953 31 271
- (103) T. KARIYON et T. MATSUMO, J. Pharm. Soc. Japan 1954 74 363
- (104) R.M. HOROWITZ et B. GENTILI, Tetrahedron 1963 19 773
- (105) R.M. HOROWITZ et B. GENTILI, Archiv. Biochem. Biophys. 1961 92 191
- (106) A. SOSA et Ch. SANNIE, C.R. Acad. Sci. 1946 223 451
- (107) R. YAMAMOTO et Y. OSHIMA, J. Agr. Chem. Soc. Japan 1931 7 312

- (108) A. RHAMAN et A.A. KHAN, Rec.Trav.Chim. 1962 81 102
- (109) P. LEBRETON, J.Pharm. Paris 1828 14 377
- (110) E. HOFFMAN, Ber. 1876 9 685
- (111) T.E. KING et A. ROBERTSON, J.Chem.Soc. 1931 1704
- (112) P.A.J. GORIN et A.S. PERKIN, Canad.J.Chem.1959 37 1930
- (113) L.R. ROW et P.G. SASTRY, Indian J.Appl.Chem. 1962 25 86
- (114) Japan 12598 2 Sept.1960
- (115) G.P. SASTRY et L.R. ROW, J.Sci.Ind.Research(India)1960 19B 500
- (116) T. MATSUMO Yakugaku Zasshi 1959 79 540
- (117) A.H. ROUSSE, Proc.Florida State Hort.Soc. 1953 65 213
- (118) J.W. KESTERSON et R. HENDRICKSON, Citrus Ind.1952 33 6,12
- (119) R. HENDRICKSON et J.W. KESTERSON, Univ.Floride Agr.Expt.Sta.  
Bull. 1954 545
- (120) R.M. HOROWITZ et B. GENTILI, Nature 1960 185 319
- (121) R.M. HOROWITZ et B. GENTILI, J.Am.Chem.Soc.1960 82 2803
- (122) A. MAGER, Z.Physiol.Chem. 1942 274 109
- (123) G.P. SASTRY et L.R. ROW, J.Sci.Ind.Research(India)1961 20B 187
- (124) G.P. SASTRY et L.R. ROW, Tetrahedron 1961 15 111
- (125) N. ICHIKAWA et T. YAMASHITA, J.Chem.Soc.Japan 1941 62 1006
- (126) J.M. SEHGRAL, T.R. SESHADRI et K.L. VADEHRA, Proc.Ind.Acad.Sci.  
1955 42A 252
- (127) A. BELLINO, P. VENTURELLA et S. CUSMANO, Ann.Chim.(Rome)1962  
52 795
- (128) K.F. TSENG, J.Chem.Soc. 1938 1003
- (129) R. ROBINSON et K.F. TSENG, J.Chem.Soc. 1938 1004
- (130) T. TSUKAMOTO et T. OKTAKI, J.Pharm.Soc.Japan 1947 67 40
- (131) L.S. SWIET, J.Org.Chem. 1960 25 2067
- (132) P. VENTUNELLA, A. BELLINO, et S. CUSMANO, Ann.Chim.(Rome)1961 51  
105
- (133) P.S. SARIN et T.R. SESHADRI, Tetrahedron 1960 8 64
- (134) E.K. NILSON, J.Am.Chem.Soc. 1924 56 1392
- (135) K.C. PATNYAK, S. RANGASWANI et T.R. SESHADRI, Proc.Ind.Acad.Sci.  
1942 16A 10

- (136) R. BABIN, J. BEAUVIEUX, J. BARABON, P. BLANQUET, F. COUSTOU,  
H. DAX, G. DELMON, R. DUFOUR, R. TINGAUD et G. VITTE, Bull.  
Acad. Nat. Med. 1959 143 720
- (137) L. JURD, Archiv. Biochem. Biophys. 1957 60 284
- (138) L. S. SWIFT, J. Am. Chem. Soc. 1952 74 1099
- (139) L. R. ROW et G. P. SASTRY, J. Sci. Ind. Research 1962 21B 343
- (140) Ph. LEBRETON, D. PILLON et J. PIOLAT, C. R. IX Colloq. Spectros.  
Int. Lyon 1963 143
- (141) Ph. LEBRETON, Communication personnelle
- (142) F. NAKAOKI, V. MORITA et A. ISETANI Yakugaku Zasshi 1961 81  
558
- (143) J. CHOPIN, G. DELLAMONICA et Ph. LEBRETON, C. R. Acad. Sci. 1963  
257 534
- (144) L. REIO dans M. LEDERER, Chromatographic Reviews Elsevier  
1959 I 39
- (145) L. HORHAMMER, H. WAGNER et F. GLOGGENGIESSER, Archiv. Pharm.  
1958 291 126
- (146) A. G. PERKIN, J. Chem. Soc. 1898 73 1019
- (147) G. BARGER, J. Chem. Soc. 1906 89 1210
- (148) H. G. KING, J. Sci. Food Agr. 1962 27 140
- (149) J. B. HARBORNE, Phytochem. 1964 3 421
- (150) R. M. HOROWITZ et B. GENTILI, Chem. and Ind. 1964 498
- (151) J. SHINODA et S. SATO, J. Pharm. Soc. Japan 1928 48 791
- (152) J. SHINODA et S. SATO, J. Pharm. Soc. Japan 1929 49 71
- (153) J. H. LOOKER et M. JHON, J. Org. Chem. 1960 25 1829
- (154) K. NAKAJAWA et T. MIYATA Yakugaku Zasshi 1962 82 927
- (155) M. MURTI et T. R. SESHADRI, Proc. Ind. Acad. Sci. 1949 29A 1
- (156) K. C. GULATI, S. R. SETH et K. VENKATARAMAN, J. Chem. Soc. 1934 1765
- (157) B. Z. MULLAJI et R. S. SHAH, Proc. Ind. Acad. Sci. 1961 34A 88
- (158) E. A. BRAUDE, F. SONDHEIMER et W. F. FORBES, J. Chem. Soc. 1955 3754
- (159) D. J. CRAMM et F. W. CRANG, J. Am. Soc. 1950 72 595
- (160) C. ENEBACK, Acta Chem. Scand. 1957 11 895
- (161) E. A. BRAUDE, F. SONDHEIMER et W. F. FORBES, Nature 1954 173 117

- (162) W. RIEDL, J. NICKL, K. H. RISSE et P. MITTELDORF, Ber. 1956 89 1849  
(163) A. C. JAIN et T. R. SESHADRI, Proc. Ind. Acad. Sci. 1955 42A 279  
(164) F. H. CURD et A. ROBERTSON, J. Chem. Soc. 1933 437  
(165) J. CHOPIN et P. DURUAL, C. R. Acad. Sci. 1963 257 700  
(166) R. C. FUSON, Organic synthesis 15 70  
(167) R. C. FUSON, Organic synthesis 18 75
-



## TABLE DES MATIERES

### INTRODUCTION

### CHAPITRE I : METHODES D'ISOLEMENT ET DE CARACTERISATION

- 1.1. Extraction
- 1.2. Techniques d'analyse des extraits
  - 1.2.1. Précipitation par les sels de plomb
  - 1.2.2. Chromatographie sur papier
    - 1.2.2.1. Choix du papier
    - 1.2.2.2. Solvants
    - 1.2.2.3. Révélation des composés flavoniques
    - 1.2.2.4. Relation R<sub>f</sub>-structure
  - 1.2.3. Chromatographie sur colonne
  - 1.2.4. Chromatographie en couche mince
  - 1.2.5. Distribution à contre-courant
    - 1.2.5.1. Théorie de la distribution de CRAIG
    - 1.2.5.2. Appareillage
    - 1.2.5.3. Applications aux composés flavoniques
- 1.3. Caractérisation et détermination des structures
  - 1.3.1. Méthodes chimiques de caractérisation
    - 1.3.1.1. Réactions colorées
    - 1.3.1.2. Dégradations alcalines
    - 1.3.1.3. Hydrolyse des glycosides
- 1.4. Détermination des structures à l'aide des spectres U.V.
  - 1.4.1. Cas des flavones et flavonols
  - 1.4.2. Cas des flavanones
  - 1.4.3. Cas des aures

### CHAPITRE II : COMPOSES FLAVONIQUES DE L'ECORCE DE CITRON

- 2.1. Travaux antérieurs
  - 2.1.1. Flavanones
  - 2.1.2. Flavones et flavonols
- 2.2. Extraction
  - 2.2.1. Extraction aqueuse
  - 2.2.2. Extraction par solvants organiques

- 2.3. Etude de la fraction précipitable en milieu neutre par l'acétate de plomb
  - 2.3.1. Distribution à contre-courant
  - 2.3.2. Chromatographie préparative et identification des composés
    - 2.3.2.1. Etude de la fraction 6
    - 2.3.2.2. Etude de la fraction 5
    - 2.3.2.3. Etude de la fraction 2
- 2.4. Etude de la fraction précipitable par l'acétate de plomb en milieu alcalin
  - 2.4.1. Séparation sur colonne de cellulose
  - 2.4.2. Etude des fractions 4 à 13
    - 2.4.2.1. Etude de la bande de Rf 0,40
    - 2.4.2.2. Etude de la bande de Rf 0,58
  - 2.4.3. Etude des fractions 14 à 30
- 2.5. Discussion

### CHAPITRE III : BENZYLATION ANORMALE DE LA PHLORACETOPHENONE

- 3.1. Essai de synthèse de l'ériodictyol
  - 3.2. Benzylolation anormale de la phloracétophénone
  - 3.3. Conclusions
- Partie expérimentale

### CONCLUSIONS GENERALES

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DEUXIEME THESE

---

Propositions données par la Faculté

LES C-GLYCOSIDES NATURELS

Vu:

Les Membres du Jury

J.COLONGE

J.CHOPIN

H.PACHECO

Vu et approuvé :

Le Doyen de la Faculté des Sciences

Pour le Doyen

L'Assesseur :

G.MESNARD

Vu et accordé le permis d'imprimer:

LYON, le 8 Octobre 1964

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université,

P.LOUIS

L M D

99, Av. de Saxe, LYON

Dépôt Légal - Octobre 1964



